



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Académico Química Básica y Aplicada

**Estudio *in vitro* y en campo de la acción biácida del
extracto acuoso de la corteza de catahua sobre los
fitopatógenos de mayor incidencia del algodónero**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Diana Krystel NEYRA CRUZ

ASESOR

César Máximo FUERTES RUITÓN

Lima, Perú

2010



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Neyra D. Estudio *in vitro* y en campo de la acción biácida del extracto acuoso de la corteza de catahua sobre los fitopatógenos de mayor incidencia del algodónero [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Académica Profesional de Química Básica y Aplicada; 2010.

DEDICATORIA

Dedico este triunfo a mi madre Isabel quien siempre confió en mí y que con mucho amor me ha enseñado a querer ser una persona mejor cada día, a cumplir todas mis metas y a convertir mis sueños realidad.

A mi padre Carlos por brindarme su apoyo y motivación.

A mi hermano Carlos por ser mi amigo y mi guía.

AGRADECIMIENTOS

Al profesor Mg. César Fuertes Ruitón, a quién le expreso mi más profundo agradecimiento, por sus enseñanzas, confianza y paciencia.

A la profesora Q.F. Bertha Jurado por su asesoría durante la realización de este proyecto

A la Dra. Elizabeth Núñez por su ayuda incondicional.

A la Q.F. Lily Bendezú por su comprensión y motivación.

A todo el equipo del proyecto “Catálogo del Algodonero” por su constante apoyo.

Esta tesis ha sido financiada por el Programa de Ciencia y Tecnología, Perú BID (FINCyT)

ÍNDICE

	Páginas
RESUMEN SUMMARY	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. GENERALIDADES	3
2.1 Nombres comunes	3
2.2 Clasificación taxonómica de “catahua”	3
2.3 Distribución geográfica	3
2.4 Características morfológicas	4
2.5 Usos	5
2.6 Constituyentes fitoquímicos	6
2.7 Propiedades biocidas <i>in vitro</i> de <i>Hura crepitans</i>	6
2.8 Biopesticidas de origen vegetal	7
2.9 Descripción general del algodón	7
2.10 Factores edáficos del algodón	9
2.11 Fenología del algodón	9
2.12 Algodón orgánico	10
2.13 Plagas del algodonero	12
2.14 Ciclo de vida de <i>Bemisia tabaci</i> (Gennadius) Biotipo B	14
2.15 Ciclo de vida de <i>Aphis gossypii</i>	17
III. PARTE EXPERIMENTAL	21
3.1 Materiales y métodos	21
3.2 Recolección de la muestra vegetal	23
3.3 Preparación del extracto	23
3.4 Screening fitoquímico	23
3.5 Análisis cromatográfico	24
3.6 Perfil espectrofotométrico	24
3.7 Determinación UV de metabolitos	24
3.8 Cuantificación de metabolitos	24
3.9 Análisis por HPLC	25
3.10 Bioensayo de toxicidad en <i>Artemia salina</i>	26

3.11	Crianza de los insectos	28
3.12	Prueba <i>in vitro</i>	30
3.13	Prueba de campo	33
IV.	RESULTADOS	39
4.1	Screening fitoquímico	39
4.2	Análisis cromatográfico	39
4.3	Perfil espectrofotométrico	40
4.4	Determinación UV de metabolitos	41
4.5	Cuantificación de metabolitos	42
4.6	Análisis por HPLC	43
4.7	Bioensayo de toxicidad en <i>Artemia salina</i>	43
4.8	Prueba <i>in vitro</i>	44
4.9	Prueba de campo	48
V.	DISCUSIÓN	63
VI.	CONCLUSIONES	66
VII.	RECOMENDACIONES	67
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
IX.	ANEXOS	74

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la actividad biocida *in vitro* y en campo mediante el método de aspersión directa del extracto acuoso liofilizado de la corteza de *Hura crepitans* sobre los fitopatógenos del algodón *Aphis gossypii* “pulgón de la melaza” y *Bemisia tabaci* “mosca blanca”. Se realizó el estudio fitoquímico cualitativo y cuantitativo, análisis por espectrofotometría UV y por HPLC de los metabolitos presentes en la corteza de *Hura crepitans*. Los resultados obtenidos fueron analizados por el método Probit, éstos demuestran que *Hura crepitans* tiene actividad biocida sobre *Aphis gossypii* con un CL50 de 0.156 (mg/mL). La dosis efectiva en el estudio *in vitro* fue de 50mg/mL. Con respecto al estudio en campo, la dosis probada y efectiva fue de 2.85mg/mL. El extracto acuoso de la corteza de *Hura crepitans* no presentó actividad biocida sobre *Bemisia tabaci*. Los metabolitos encontrados fueron: rutina, saponinas y otros compuestos fenólicos. En conclusión, el extracto acuoso de la corteza de *Hura crepitans* presenta actividad biocida sobre *Aphis gossypii* a nivel de laboratorio y en campo pero no tiene actividad biocida sobre *Bemisia tabaci*.

Palabras clave: *Hura crepitans*, catahua, biocidas, algodón, *Aphis gossypii*, *Bemisia tabaci*, insecticidas.

SUMMARY

In the current study, it was evaluated the *in vitro* and field biocide activity by the direct spray method of the *Hura crepitans* cortex's lyophilized aqueous extract on the cotton phytopathogens *Aphis gossypii* "cotton aphid" and *Bemisia tabaci* "whitefly". Also, a qualitative and quantitative phytochemical study, UV analysis and HPLC analysis of the *Hura crepitans* cortex's metabolites was performed. The obtained results were analyzed by the Probit method. They show that *Hura crepitans* has biocide activity over *Aphis gossypii* with a CL50 of 0.156 (mg/mL). In the *in vitro* study, the more effective dose was 50mg/mL. With regard of the field study, the proved and effective dose was 2.85mg/mL. The *Hura crepitans* cortex's lyophilized aqueous extract did not show any activity over *Bemisia tabaci*. The found metabolites were: rutine, saponines and other phenolic compounds. In conclusion, the *Hura crepitans* cortex's lyophilized aqueous extract does have a biocide activity over *Aphy gossypii* but does not have a biocide activity over *Bemisia tabaci*.

Keywords: *Hura crepitans*, catahua, biocides, cotton, *Aphis gossypii*, *Bemisia tabaci*, insecticides.

I. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo de investigación resulta importante debido a que el algodón es uno de los cultivos comerciales con mayor aplicación de productos químicos. Esta acción ha conllevado a que las plagas se vuelvan resistentes ocasionando la reducción del rendimiento, daños en la salud humana y en el medio ambiente, sumado al aumento de los costos de producción, es de necesidad urgente nuevas alternativas sostenibles y de bajo costo. Una de las alternativas eficaces son los biopesticidas de origen vegetal con actividad biocida, capaces de eliminar las plagas que atacan los cultivos de manera eficiente y permitir la conservación del medio ambiente y de la fauna benéfica dentro de los campos cultivados.

En los últimos años ha aumentado la demanda de productos fitosanitarios, carentes de riesgo y con débil persistencia en el medio ambiente. Los biopesticidas de origen vegetal cumplen con estos parámetros al presentar los siguientes beneficios:

- Poseer moléculas derivadas de su metabolismo secundario por lo que son raramente tóxicas para los mamíferos y el hombre.
- Ser poco persistentes por su rápida biodegradabilidad.
- Poseer diferentes mecanismos de actividad, por lo que existe una baja probabilidad de que los insectos desarrollen resistencia.
- Ser altamente específicos, por lo que actúan a bajas dosis.

Además, los biopesticidas de origen vegetal tienen bajo costo por lo que constituyen una alternativa útil para los agricultores. El uso de éstos, a su vez, incrementaría el precio del algodón, ya que tendría una mayor calidad que el tratado con insecticidas de síntesis.

Los objetivos de este estudio son los siguientes:

- Objetivo principal:
 - Determinar la acción biocida del extracto acuoso liofilizado de la corteza de la especie vegetal *Hura crepitans* “catahua” sobre dos fitopatógenos del algodonero *in vitro* y en campo.

- Objetivos específicos:
 - Determinar la dosis del extracto acuoso liofilizado con la cual se alcanza la mayor mortalidad de los fitopatógenos.
 - Efectuar el estudio fitoquímico y elucidar la estructura de los principales metabolitos que permita correlacionar la acción biocida.

II. GENERALIDADES

2.1. Nombres comunes

Conocido como sandbox tree, possumwood, hura en Estados Unidos; salvadera, haba en Cuba; javilla, molinillo en Puerto Rico; ceibo, tronador, nuno en Panamá; ceibo mil pesos, ceibo de leche, castañeto, arenillo en Colombia; catahua, catahua amarilla, catahua blanca en Perú; jabillo, ceiba blanca, ceiba habillo, jabillo mataperro en Venezuela y como catáuá, arriero, catavá en Brasil.^(1,2)

2.2 Clasificación taxonómica de *Hura crepitans* “catahua”

División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Orden	:	Euphorbiales
Familia	:	Euphorbiaceae
Género	:	Hura
Especie	:	<i>Hura crepitans</i> L.

2.3. Distribución geográfica

El área de distribución natural de la catahua se extiende desde Costa Rica hasta Brasil y el área amazónica de Bolivia. La especie también crece a través de las Antillas Menores y Mayores.⁽³⁾ En el Perú, en la Amazonía Baja y Alta hasta 2 000 msnm.⁽⁴⁾ (Figura 1)

La catahua se cultiva en Hawaii, la Florida, California, las Bahamas y las Indias Occidentales Holandesas y extensamente en los trópicos del Viejo Mundo. Se ha naturalizado en África Occidental.⁽³⁾



Figura 1.- Distribución de *Hura crepitans*, en el Neotrópico. El área sombreada indica las zonas donde está distribuido *Hura crepitans*.

Fuente: *Hura crepitans* L.

2.4. Características morfológicas

Árbol monoico con altura de hasta 45m y diámetro de hasta 200cm; fuste recto, cilíndrico, con presencia de aristas poco conspicuas que se ramifica hasta un 50% de su altura, con la base abultada por raíces engrosadas, copa densa e irregular. La corteza externa de color marrón grisáceo, fisurada longitudinalmente.^(4,5)

Las hojas son simples, alternas, helicoidales, ovadas a lo ancho, de 7 a 8.5cm de ancho y de 10 a 15cm de largo; pecíolo de 7 a 14cm; base cordada, ápice acuminado, con dos glándulas notorias en la base; de 15 a 18 pares de nervios secundarios.

Flores femeninas solitarias, zigomorfas, de 6 a 7cm de longitud, color rojo púrpura; flores masculinas en espigas de 12 a 16cm de largo con el eje hueco, glabro, péndulas, con flores actinomorfas de 1 a 1.5cm de largo y numerosas anteras blancas, sésiles.

Los frutos son cápsulas esféricas de color verde a gris oscuro parduzco, de 6 a 8cm de largo; epicarpio leñoso y dividido en 12 secciones; pedúnculo de 3.5cm de largo. Cuando maduran explotan con fuerte detonación lanzando las semillas hasta 50m de distancia. (Figura 2)

La madera es moderadamente dura y moderadamente pesada, con peso específico de 0.25g/cm^3 . La albura de color blanco cremoso y el duramen parado amarillento pálido a gris olivo. Posee grano de recto a entrecruzado, textura media y brillo mediano.⁽⁵⁾

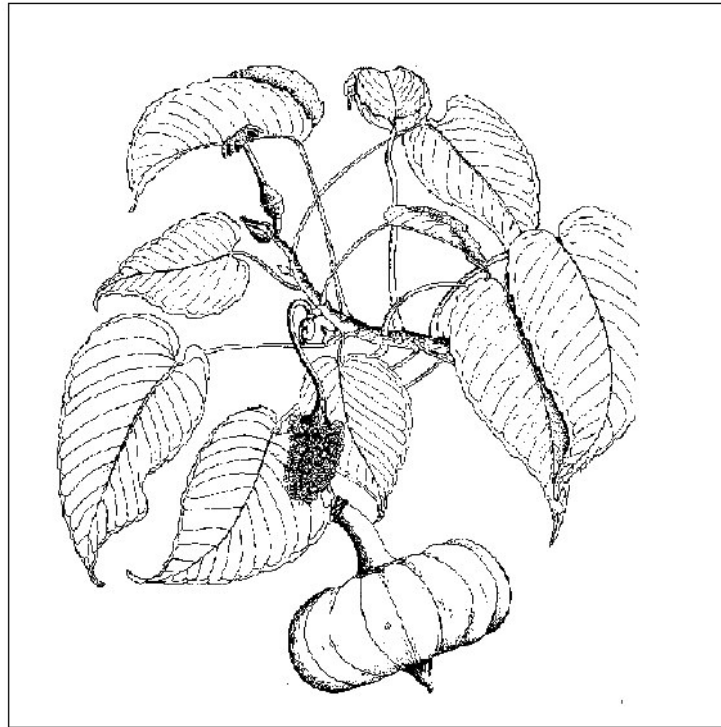


Figura 2.- Detalle de las hojas, flores y fruto de *Hura crepitans*.

Fuente: *Hura crepitans* L.

2.5. Usos

La madera de catahua se usa en la carpintería general y ensambladuras y para hacer cajas, jabas, molduras interiores, partes interiores de muebles, triplex y tableros de partículas.⁽³⁾

La savia de catahua es altamente cáustica y venenosa. Su resina en agua se usa como insecticida para fumigar cultivos de maíz, yuca y hortalizas; también tiene uso medicinal como analgésico, antiasmático, antidiarréico, purgante, antihelmíntico y vomitivo entre otros.⁽⁴⁾

2.6. Constituyentes fitoquímicos

Los principios activos aislados son toxialbumina, crepitina y hurina,⁽⁴⁾ presenta flavonoides⁽⁶⁾, ácido p-cumárico y ácido ferúlico, huraina, huratoxina, inositol, caempferol, 24-metilen-cicloartenol, butirospermol, crepitina y cicloartenol.^(7,8)

Barbieri y colaboradores⁽⁹⁾ aislaron e identificaron dos lectinas con actividad aglutinante pero sin especificidad para sangre humana a partir del látex de *Hura crepitans*. La lectina induce la producción de linfocitos T pero no de linfocitos B.⁽¹⁰⁾

Las semillas de catahua contienen aceites casi en un 50% principalmente ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oléico y ácido linoléico.⁽¹¹⁾ Se ha reportado que éstas contienen 36.03% de proteína y 49.7% de aceites, que probablemente poseen actividad biocida.⁽¹²⁾

2.7. Propiedades biocidas *in vitro* de *Hura crepitans*

Adedire⁽¹³⁾ estudió la actividad insecticida de las semillas de *Hura crepitans* sobre el “gorgojo de las leguminosas” *Callosobruchus maculatus* F. en los estadíos de oviposición, emergencia de adultos, estadíos inmaduros y en su competitividad reproductiva, los resultados demostraron que los aceites esenciales de las semillas de catahua redujeron la oviposición en mas del 50% a la concentración mínima de aceite (i.e. 0.1% p/v) e inhibieron la emergencia de adultos en su totalidad para todas las concentraciones excepto al 0.1% v/w. También se reportó efecto ovicida en un 100% para todas las concentraciones mientras que el efecto larvicida se obtuvo en un 100% a 0.2ml, 0.3ml y 0.4mL de aceite por 20G de semillas y 100 larvas. La competitividad reproductiva de los insectos tratados con los aceites esenciales se redujo al aumentar la concentración aplicada. La frecuencia en la copulación se redujo en un promedio de 13.25 veces a cero, en concentraciones de 1.5% y 2% de aceite. De forma similar, una frecuencia promedio de apareamiento de 10.5 veces en hembras se redujo a cero, en concentraciones de 1.5% y 2% de aceite.

2.8. Biopesticidas de origen vegetal

A todas aquellas plantas con actividad biocida se les conoce como biopesticidas de origen vegetal, fitoinsecticidas o insecticidas botánicos. Regnault y colaboradores las definen como “moléculas fitoquímicas de síntesis biológica con carácter fitosanitario.”^(14,15)

Según reportes más de 2000 especies de plantas en el mundo tienen propiedades plaguicidas.⁽¹⁶⁾

2.9. Descripción general del algodón

El cultivo de algodón es de importancia global y tiene un alto valor comercial. Se produce en países como China, Estados Unidos, India, Pakistán, Turquía, Australia, Grecia, Brasil, Egipto, Perú, entre otros donde las condiciones climáticas son las más adecuadas para su cultivo.

La producción mundial de algodón para el periodo 2004-2005 fue de 120.4 millones de pacas (218.2 kg/paca) el más alto registrado. China fue el productor número uno de algodón en dicho periodo con un estimado de 29 millones de pacas. Estados Unidos fue el segundo con alrededor de 23 millones de pacas, seguido por India con 19 millones de pacas, Pakistán 11 millones de pacas y Brasil, que produjo casi 6 millones de pacas.⁽¹⁷⁾

La planta del algodón pertenece al género *Gossypium*, familia de las malváceas. Se conoce más de 30 especies entre las que figuran *G. hirsutum* L., *G. barbadense* L., *G. arboreum* L. y *G. herbaceum* L. Existen especies anuales, plurianuales y perennes. El algodón tiene flores de color amarillo, blanco y rojo púrpura, y es de autofecundación.

- *Gossypium hirsutum*:
 - Algodón de tierras altas.
 - De 80 a 90 % de participación en el mercado mundial.
 - Fibras de corta a mediana longitud (2-3 cm; variedad de fibra mediana).

- *Gossypium barbadense*:
 - Algodón de Sea Island.
 - De 10 a 20 % de participación en el mercado mundial.
 - Fibras de alto valor de longitud hasta muy larga (3-4 cm; variedades de fibra larga).

Gossypium herbaceum, es otra especie con desarrollo anual, o el algodón arbustivo perenne *Gossypium arboreum*, que producen longitudes de fibra de 1,8 a 2,2 cm.

Las variedades de fibra larga se cultivan sobre todo en Egipto y Perú. Las variedades de fibra mediana en los Estados Unidos, las variedades de fibra corta en Asia. *G. barbadense*, variedad de fibra larga, a causa de su mayor tiempo vegetativo está expuesto a una mayor presión de plagas mientras que el *G. hirsutum*, variedad de fibra corta, madura más rápido (algunas variedades a los 150 días).

Existe también variedades de algodón con fibras coloreadas, que se ha conseguido cruzando variedades silvestres (del Perú) con las variedades de cultivo, los cuales encuentran cierto interés en el ámbito de los textiles naturales. Hasta ahora se ha cultivado predominantemente variedades de color café, verde y beige.⁽¹⁸⁾

El Perú es un país con gran historia algodонера, su siembra involucra la costa norte (Piura y Lambayeque), la costa central (Ancash, Lima e Ica principalmente) así como los departamentos selváticos de San Martín y Ucayali.⁽¹⁹⁾

En el Perú existen dos especies de algodones: *Gossypium barbadense*, conocido como algodón del país, de amplia distribución en la Costa, los valles interandinos y la Amazonía, de fibra larga, elástica y con varios colores; y el *Gossypium raimondii*, conocido como algodoncillo, una especie silvestre de la costa y vertientes occidentales del norte (valle de Chicama; valle de Santa Ana y quebrada de Huertas; margen izquierda del río Chilete). El primero fue domesticado y es ampliamente cultivado desde hace al menos 6 000 años.⁽²⁰⁾

2.10. Factores edáficos del algodón

El algodón se cultiva con éxito en todos los tipos de suelo a excepción del tipo arenoso, salino o lodoso. Tanto una temperatura adecuada del suelo y la humedad son condiciones necesarias para asegurar la germinación de las semillas y el crecimiento de la planta. La temperatura adecuada del suelo a nivel de profundidad de la semilla debe estar por encima de 18°C. Además el algodón necesita una temperatura diaria del aire de 15°C para la germinación, 21-27°C para el crecimiento vegetativo, y 27-32°C durante el periodo de fructificación.

Se requieren al menos 500mm de agua para producir la planta de algodón. En general si el agua no es un factor limitante, se necesita alrededor de 550 mm y 950mm durante toda la temporada de forma regular y consistente.^(17,21)

2.11. Fenología del algodón⁽²¹⁾

El crecimiento de la planta de algodón empieza con la germinación de la semilla y depende de la disponibilidad de humedad del suelo, temperatura y oxígeno. En condiciones favorables, la radícula emerge dentro de los 2-3 días y la plántula emerge a los 5-6 días después de la emergencia de la radícula. La primera hoja de algodón aparece a los 10-12 días después de la emergencia y el desarrollo de la hoja alcanza su máximo después de 3 semanas desde que se formaron los primeros brotes. El primer botón floral aparece en la rama más baja a los 35-45 días después de la emergencia, dependiendo de la temperatura. Los otros botones florales tienen el mismo ritmo de crecimiento a intervalos regulares hasta poco antes que el floramiento cese. El intervalo de tiempo desde que aparece el primer botón floral hasta el florecimiento puede ser de 25-30 días. Se produce la emergencia de una gran cantidad de flores por cierto tiempo, luego empieza a declinar. El periodo de florecimiento se reduce por siembra tardía, competencia fuerte entre plantas y falta de humedad.

La duración de las variedades anuales de algodón fluctúa alrededor de los 140 días. En la mayor cantidad de variedades la apertura de botones empieza a los 120 días después de la emergencia de los brotes. Desde la siembra hasta la apertura de botones, se distinguen 5 fases fenológicas:

1. Germinación y emergencia de brotes.
2. Formación de hojas verdaderas.
3. Formación de los botones florales
4. Nivel máximo de floración
5. Desarrollo de botones y apertura.

2.12. Algodón orgánico

El algodón es uno de los cultivos comerciales con uso más intensivo de productos químicos. Se estima que el algodón ocupa el 3% de la superficie total cultivada del mundo, pero utiliza el 25% de todos los insecticidas usados en la agricultura. Las plagas representan una amenaza tan seria para la producción algodonera que es casi imposible alcanzar rendimientos económicos sin mantenerlas bajo vigilancia y sin adoptar controles químicos. Las operaciones para la protección de las plantas se han convertido en un aspecto crucial en las prácticas de producción y los plaguicidas, prohibidos en los cultivos alimentarios, se utilizan comúnmente para el algodón.

Según el Pesticide Trust⁽²²⁾ (1995), el 10% de todos los productos agroquímicos se utilizan en el algodón, a diferencia del 25% en todos los vegetales y el 14% en los cereales. El arroz y el maíz son consumidores importantes de productos agroquímicos, utilizando cerca del 13% y el 11% del consumo total, respectivamente. Pero el algodón sigue siendo el principal consumidor de insecticidas.

La producción orgánica del algodón es un sistema para producir el algodón sin fertilizantes químicos sintéticos, herbicidas, insecticidas sintéticos convencionales, reguladores del crecimiento, estimuladores del crecimiento, abridores de las cápsulas ni defoliadores. Es un sistema que contribuye a la

salud de los suelos y de las personas. El sistema orgánico fomenta una mejor y mayor actividad biológica, estimula la sustentabilidad y exige manejo práctico de los sistemas de producción.

La producción orgánica tiene las siguientes características:

- El algodón orgánico sólo puede cultivarse en tierras sometidas a una preparación especial, mediante la aplicación de abono vegetal/cultivos de cobertura. No es posible desplazar aceleradamente la superficie del sistema convencional al orgánico, y a diferencia de la producción convencional, el algodón orgánico no puede cultivarse en cualquier tipo de suelo.
- La certificación por una agencia certificadora reconocida es indispensable, a menos que exista un alto grado de confianza entre el productor y el comprador. Por lo general, los servicios de certificación implican un costo. La producción orgánica plena requiere que se cumpla un período de transición, que por lo general implica dos años de producción sin utilizar productos químicos.
- Las actividades de los microorganismos en el suelo deben mantenerse a un nivel elevado para mantener a su vez, la fertilidad del suelo.
- Visto que en la producción orgánica no se permite el uso de ningún insecticida convencional, dependiendo en gran medida del control biológico. Si bien se permite el uso de ciertas sustancias especiales en el algodón orgánico, las actividades de los depredadores y parásitos tienen que maximizarse a través de medidas agronómicas y de sistemas de producción apropiados.
- Los productos agroquímicos contaminan el medio ambiente, incluyendo el suelo, el agua y el aire. La producción de algodón orgánico es inocua para el medio ambiente.
- El costo de productos cuya aplicación está permitida en un cultivo orgánico es por lo general inferior al costo de los insecticidas y fertilizantes sintéticos.
- Se esperan rendimientos más bajos en la producción orgánica. Pero el grado de reducción de los rendimientos depende en gran medida de las destrezas de cada agricultor para cultivar el algodón sin insecticidas ni fertilizantes sintéticos.

- El costo de producción podría ser superior en ciertos países, en particular en países como los EE.UU., debido a la recolección manual y a la eliminación de productos no químicos de las malezas.
- Para compensar los rendimientos inferiores y los costos de producción superiores, los productores de algodón orgánico tienen que recibir precios altos.⁽²³⁾

El cultivo ecológico del algodón ha encontrado hasta ahora su mayor expansión en los Estados Unidos (aprox. 4.000 ha). Existen también proyectos algodoneiros ecológicos en Egipto, Argentina, Brasil, Grecia, India, Nicaragua, Paraguay, Perú, Tanzania, Turquía y Uganda.⁽¹⁸⁾

La producción orgánica de algodón en el Perú data desde hace más de 20 años. Las primeras experiencias de algodón orgánico se realizaron en el valle de Cañete a principios de los años 90. El primer proyecto fue generado por la empresa Tiendas Unidas S.A. (TUSA) en el valle del Cañete, en el año de 1996. Los antecedentes del algodón orgánico no solamente se encuentran en la producción de fibra, sino también en la producción de hilo, telas y prendas finales.⁽¹⁹⁾

2.13. Plagas del algodoneiro

El algodoneiro es infestado por una gran cantidad de insectos aproximadamente 1326 especies a nivel mundial, de las cuales solo el 15% pueden considerarse plagas de importancia económica.⁽²⁴⁾

En el Perú, se han consignado 132 especies de plagas de las cuales 32 son las de mayor importancia.⁽²⁵⁾

Las plagas de mayor significación económica, por su incidencia y por el área que afectan son⁽²⁴⁾:

Dysdercus peruvianus Guer “arrebiatado”, que causa daños en el 60% del área y que en años de fuerte migración causa pérdidas que superan el 30% de la cosecha.

Anthonomus vestitus Bohn “picudo”, que afecta en su totalidad los cultivos de algodón con pérdidas que superan el 20%.

Aphis gossypii Glov. “pulgón de la melaza”, que es una plaga causante de daños de importancia al inicio y al final de la campaña.

Bucculatrix thurberiella Busk “perforador de las hojas” sólo alcanza importancia económica en la costa norte actuando sobre el 40% del área.

Tallula atramentalis Lederer “perforador del ápice de la bellota”, importante cuando la maduración del maíz coincide con el periodo de formación de bellotas del algodón. Actúa sobre el 50% del área con daños que fluctúan entre el 10 y el 15% de pérdidas.

Anomis texana Riley y *Alabama argillacea* “gusanos de hoja” son las plagas más comunes, el primero en la costa central y el segundo en la costa norte. Entre los dos actúan sobre el 100% del área pero con bajos porcentajes de pérdidas.

Pectinophora gossypiella Saunders “gusano rosado de la India”, se encuentra en todos los valles algodoneiros del país.

Bemisia tabaci “mosca blanca del tabaco”, debido al uso indiscriminado de pesticidas y al cambio climático es una plaga importante del algodón ya que produce defoliación y manchado de la fibra.

2.14. Ciclo de vida de *Bemisia tabaci* (Gennadius) Biotipo B ⁽²⁶⁻²⁸⁾

- **Ubicación taxonómica**

Orden	Hemíptera
Familia	Aleyrodidae
Sub familia	Aleurodicinae
Género	<i>Bemisia</i>
Especie	<i>Bemisia tabaci</i> (Gennadius 1889)



Figura 3.- Características de *Bemisia tabaci*

Fuente: Universidad de California

- **Distribución**

Está ampliamente distribuida en las regiones europeas, americanas y asiáticas. En cultivos de algodón de nuestro país se encuentra disperso en poblaciones con baja incidencia en los departamentos de Ica, Lima, Ancash, La Libertad, Lambayeque y Piura. Los casos de alta incidencia se dan esporádicamente a consecuencia del uso excesivo de agroquímicos y cuando las condiciones climáticas cambian bruscamente a su favor.

- **Identificación**

Para el reconocimiento de la especie se consideran los aspectos morfológicos de la ninfa de cuarto estadio o cámara pupal, en donde se muestra el orificio vasiforme alargado y el par de setas caudales notables, tan largos como el orificio vasiforme. (Figura 3)

- **Biología**

Los adultos presentan el cuerpo de coloración amarillo claro, miden 1.51 mm de longitud, están cubiertos de una secreción cérea pulverulenta blanca, tienen los ojos de color rojo oscuro. En reposo las alas se pliegan sobre el dorso formándose a manera de un tejado casi rectangular. Los huevos son cónicos, individuales y están unidos a la planta mediante un pedicelo insertado dentro del tejido. A medida que maduran toman una coloración amarilla intensa a marrón. Las ninfas están diferenciadas en 4 estadios ninfales, las que difieren en tamaño, son ovaladas, aplanadas y de color amarillento. El contorno es irregular cuando las hojas de algunas variedades son pubescentes. Las pupas se desarrollan internamente dentro de la cámara formada por el último estadio ninfal. (Figura 4)



Figura 4.- Esquema de los estados biológicos de *Bemisia tabaci*: huevo (izquierda),
ninfa (medio), adulto (derecha)

Fuente: Beorganic

El ciclo biológico en condiciones de campo, a 30°C y 50% HR, presenta las siguientes duraciones expresado en días (Tabla 1)

Tabla 1.- Duración de las fases biológicas de *Bemisia tabaci* expresada en días

Fases biológicas	Días
Incubación	10
Estadio ninfal	16
Longevidad adulto hembra	08
Longevidad adulto macho	05
Desarrollo de huevo a adulto	26
Ciclo total en hembras	34
Ciclo total en machos	31

Fuente: SENASA

- **Daños al algodonero**

Directos: Deshidratación y disminución del crecimiento por succión de la savia e inyección de toxinas.

Indirectos: Evita y disminuye la fotosíntesis y respiración de la planta, al cubrir todo el envés de las hojas con las ninfas, la mielecilla y cera que secretan, que a la vez sirve de medio de cultivo para el hongo *Capnodium* que existe en el ambiente, desarrollando como consecuencia a la fumagina que se observa como hollín en las hojas atacadas.

Bemisia tabaci es buen vector de enfermedades por lo que la especie es transmisora del geminivirus que le confiere un aspecto plateado, iniciando la deshidratación y muerte de plantas, especialmente cultivos hortícolas.

- **Incidencia de la plaga de acuerdo al desarrollo fenológico del cultivo**

La plaga hace su aparición en el estado adulto desde que presenta las hojas cotiledonares depositando sus posturas en ellas y en las primeras hojas verdaderas se van repitiendo las generaciones subsiguientes durante todo el desarrollo fenológico del cultivo, especialmente en los meses de verano.

- **Factores favorables**

Temperatura	24-30°C.
Humedad relativa	55-75%
Tipo de suelo	arenoso.
Aplicación de	agroquímicos.

2.15. Ciclo de vida de *Aphis gossypii*

- **Ubicación Taxonómica**

Orden	Hemíptera
Sub orden	Sternorrhyncha
Familia	Aphididae
Sub familia	Aphidinae
Género	Aphis
Especie	<i>Aphis gossypii</i> (Glover 1877)

- **Distribución**

Especie cosmopolita, con amplio rango de plantas hospederas, entre especies ornamentales, herbáceas y arbóreas.

- **Identificación**

Son individuos pequeños, frágiles de cuerpo globoso y color verde en su mayoría, miden aprox. 2-4 mm, las poblaciones están formadas por hembras aladas y ápteras.

Presentan un par de estructuras tubulares de color y forma variable llamadas sífonos o cornículos y una cauda al final del abdomen. Ambas sirven para la identificación de la especie.

Las hembras aladas de *Aphis gossypii* miden 1,5 a 1,7 mm. La cabeza y el tórax son negro opaco, los ojos rojos y el abdomen amarillento verdoso con

manchas negras en la mitad del cuerpo. Las antenas son oscuras, más cortas que el cuerpo. Los cornículos son negros, o con una mancha oscura que se extiende desde su base. Son cilíndricos y con corona distintiva debido a suaves imbricaciones. La cauda, suavemente esférica verde oscura, más pálida y de longitud igual a la mitad del largo de los cornículos, con 5 a 7 setas laterales. Las patas son pardo amarillentas, con ápices de las tibia y tarsos más claros. Las hembras ápteras son similares en color y tamaño a las aladas, los cornículos son ligeramente más largos que el tercer segmento de las antenas. (Figura 5)



Figura 5.- Características de *Aphis gossypii*

Fuente: UNMSM

- **Biología**

Los áfidos o pulgones son especies altamente polífagos. Las poblaciones presentan dos tipos de individuos en su dinámica de población y dispersión que son: las hembras que van a fundar nuevas colonias llamadas fundatrices y las hembras generadoras de las pobladoras de nuevos brotes de las plantas: las generatrices. (Figura 6)



Figura 6.- Hembras fundatrices (izquierda) y generatrices (derecha) de *Aphis gossypii*

Fuente: UNMSM

Ambos secretan hemolinfa por los sifones para alertar a la población de un peligro. Son insectos oportunistas que tienen poblaciones transitorias, habitan zonas templadas; han desarrollado estrategias como ovoviviparidad, polimorfismo y partenogénesis que les ayuda a adaptarse a las condiciones climáticas. Típicamente los áfidos se congregan en el envés de la hoja y en los brotes apicales. Las colonias de áfidos se incrementan rápidamente a principios del invierno. La reproducción es partenogenética alternante, es decir, hay generaciones partenogenéticas y generaciones sexuales. En nuestro país no se presentan las generaciones sexuales, por lo que la metamorfosis es sencilla. Las hembras generatrices en un momento determinado, por cambios climáticos o por ausencia de brotes tiernos en los cultivos, generan hembras fundatrices quienes migran hacia otras plantas hospederas. Una vez instalada en el cultivo se multiplica produciendo hembras ápteras, las que se multiplican rápidamente, poblando los brotes. Son las más abundantes. En este caso la reproducción es partenogenética y pertenece al ciclo anholocíclico. En países con invierno marcado se presenta la etapa sexuada y hay producción de huevos, pertenece al ciclo completo u holocíclico.^(29,30)

El ciclo biológico en condiciones de campo, a 20°C y 75% HR, presenta las siguientes duraciones expresado en días (Tabla 2)

Tabla 2.- Duración de las fases biológicas de *Aphis gossypii* expresada en días

Fases biológicas	Días
Estadio ninfal	24
Longevidad adulto hembra	28
Ciclo total	52

Fuente: SENASA

- **Daños al algodónero**

Directos: Las ninfas y los adultos extraen el floema (nutrientes) de la planta y alteran el balance de las hormonas del crecimiento originando el debilitamiento de la planta, las hojas se enrollan. La pérdida de hojas se traduce en una reducción de la producción final y si el ataque es muy severo puede provocar la muerte de la planta.

Indirectos: Reducción de la tasa fotosintética en las hojas enrolladas, la mielecilla y cera que secretan, que a la vez sirve de medio de cultivo del hongo *Capnodium* que existe en el ambiente, desarrollando como consecuencia a la fumagina que se observa como hollín en las hojas atacadas. Los pulgones son vectores de enfermedades fúngicas y virales.

- **Incidencia de la plaga de acuerdo al desarrollo fenológico del cultivo**

Las colonias de áfidos se incrementan rápidamente a principios del invierno y llegan a su máxima expresión en primavera.

- **Factores favorables**

Temperaturas	20-30 °C.
Humedad relativa	50%
Riegos	escasos
Polvo	acumulado
Aplicaciones de	agroquímicos.

III. PARTE EXPERIMENTAL

La recolección de *H. crepitans* y otras especies biocidas estuvo a cargo del biólogo José Campos de la Cruz. La clasificación botánica se llevó a cabo en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. El extracto acuoso se conservó en refrigeración y liofilizado, en el laboratorio de Productos Naturales Colichón S.A.C. La crianza de los insectos fue realizada en el Servicio Nacional de Sanidad Agraria SENASA, las pruebas *in vitro* fueron hechas en el Laboratorio de Orgánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM y por último la prueba de campo fue llevada a cabo en el campo experimental perteneciente al Instituto Nacional de Innovación Agraria INIA.

3.1 Materiales y métodos

- Análisis cuali-cuantitativo
 - Material de vidrio de laboratorio
 - Cromatoplasmas de silicagel G₆₀
 - Silicagel
 - Papel filtro Whatman N° 1
 - Cromatofolios de silicagel en aluminio 60F₂₅₄
 - Micropipetas
 - Secadora
 - Cuba cromatográfica
 - Balanza analítica Acculab Sartorius Group ALC-210.4
 - Baño maría Memmert
 - Estufa ODHG-9053A
 - Molino de cuchillas
 - Espectrofotómetro UV Thermo Scientific Genesys 6.0
 - HPLC Hitachi Elite LaChrom
- Prueba *in vitro*
 - Material de vidrio de laboratorio
 - Envases de polipropileno
 - Algodón

- Tijeras
 - Aspersores
 - Papel toalla
 - Pinceles
 - Estereoscopio
- Prueba de campo
 - Wincha
 - Estacas
 - Cuchilla
 - Etiquetas
 - Rafia
 - Lupa
 - Mochila de 20 litros (trombón manual Atlas de boquilla regulable y alcance hasta 6-7 m)
 - Balde de 20 litros.
 - Jarras de 1, 2 y 3 L.
 - Jeringas
 - Agua destilada
 - Equipo de protección: botas de jebe, guantes, mascarilla
 - Microscopio estereoscópico binocular LabKlass modelo MZS 0745 LR
 - Insecticida agrícola concentrado soluble de rotenona 100.3 g/L “Rotebiol”
 - Acidificante con indicador de pH “Best Water”
 - Aceite vegetal Wett’ Oil 930g/L
 - Campo de algodón (*Gossypium barbadense*)

Especie que se siembra en la costa central, sembrado el 15 de Setiembre del 2009, con un distanciamiento de 0.3 m. entre golpes de plantas y 1.40 m. entre surcos, con un abonamiento de 200 unidades de nitrógeno + 100 unidades de fósforo + 100 unidades de potasio (200 N – 100 P – 100 K) , sistema de riego por goteo, las plantas presentaron una altura promedio de 2 m. y se encontraron en apertura de bellotas del tercio medio, el campo no

tuvo ninguna aplicación de productos químicos para el control de plagas y enfermedades.

3.2. Recolección de la muestra vegetal

La muestra de *Hura crepitans* se recolectó en Jaén (altitud 650 m.s.n.m.). Se raspó la corteza externa para retirar las espinas, luego con un machete se extrajo la corteza en corte longitudinal. Se cortó en trozos pequeños y se procedió a secar a la sombra a temperatura ambiente (aproximadamente a 25º C). La recolección de *H. crepitans* estuvo a cargo del biólogo José Campos de la Cruz. La clasificación botánica se llevó a cabo en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.3. Preparación del extracto

La corteza se virutó y se pesó para posteriormente ser llevada a estufa por 24 horas a 40º C para eliminar la humedad. Cuando la muestra presentó un peso constante, se sometió a molienda. De la muestra en polvo se pesó 525g y se le adicionó 5L de agua destilada. Se sometió a baño maría a 80º C por 1 hora. Luego se filtró en tibio. Al residuo sólido se le adicionó 500mL de agua destilada para realizar una segunda extracción bajo las mismas condiciones señaladas. Se obtuvo 3.215 L de extracto acuoso. El extracto acuoso se conservó liofilizado en refrigeración, en el laboratorio de Productos Naturales Colichón S.A.C. Ate-Lima. Las muestras fueron almacenadas en recipientes etiquetados dentro de un desecador, el liofilizado fue utilizado para el análisis fitoquímico, ensayo de toxicidad, ensayo *in vitro* y ensayo en campo. Se obtuvo 65g de liofilizado que representa el 12.38% de la muestra inicial.

3.4. Screening fitoquímico

Se realizó según el método de Olga Lock de Ugaz.⁽³¹⁾

3.5. Análisis cromatográfico

Se utilizaron como soporte cromatofolios de silicagel 60F 254 de 20cm x 20cm, de 2mm de espesor. Como fase móvil se utilizó el sistema de solventes n-butanol: ácido acético: agua 8:1:1 V/V. La placa se reveló con vainillina sulfúrica al 2% en etanol.⁽³¹⁾

3.6. Perfil espectrofotométrico⁽³²⁾

Se utilizó 30mg del extracto acuoso liofilizado de la corteza de *Hura crepitans* a la cual se hizo una extracción con éter dimetílico, luego con alcohol metílico y por ultimo con propilenglicol.

3.7. Determinación UV de metabolitos

Se utilizó el método descrito por Mabry T. et al.⁽³³⁾

3.8. Cuantificación de metabolitos

- **Flavonoides:**

Método: Espectrofotométrico

Longitud de onda: 510 nm

- Metodología:

Se disolvió 20mg del liofilizado del extracto acuoso de la corteza de *Hura crepitans* en 2 mL de agua destilada. Luego se agregó 1.5mL de reactivo tricloruro de aluminio y se agregó 0.5 mL de nitrito de sodio al 7.5% y se dejó reposar por 5 minutos. Por último se agregó 0.5 mL de hidróxido de sodio 2M y se completó con agua destilada hasta 6mL. A partir de cada solución se prepararon diluciones 1:2. La absorbancia se midió a 510nm.⁽³⁴⁾

- **Fenoles totales⁽³⁵⁾:**

Método: Espectrofotométrico Folin – Ciocalteau.

Longitud de onda: 741nm.

- Metodología:

Se disolvió 5 mg de del liofilizado del extracto acuoso de la corteza de *Hura crepitans* en 0.7mL de agua. Se añadió 7mL de reactivo de Folin Ciocalteu al 10% y se dejó reposar por 5 minutos. Se añadió 7mL de carbonato de sodio al 7.5% y se protegió de la luz y la oscuridad por espacio de 2 horas. La absorbancia se midió a 741 nm. Para la curva de calibración se utilizó una solución estándar de fluoroglucinol (0.1mg/ml) de la cual se tomaron volúmenes de 0 µL a 100µL en intervalos de 20 µL.

3.9. Análisis por HPLC⁽³⁶⁾

Los flavonoides fueron fraccionados a partir del extracto acuoso liofilizado de la corteza de *Hura crepitans* en una columna cromatográfica cargada con silicagel de 60 (0.2 – 0.5 mm, 35 – 70 mesh) Merck, utilizando como sistema de solvente n-butanol - ácido acético - agua 8:1:1 V/V. A partir de 1 G de extracto acuoso liofilizado se obtuvieron 160 fracciones, cada una de 0.5 mL. Los eluatos fueron analizados por cromatografía en capa fina, utilizando como revelador vainillina sulfúrica. Las fracciones cromatográficamente puras fueron analizadas por HPLC-DAD bajo las siguientes condiciones:

Método:	Fase móvil en gradiente (Tabla 3)
Flujo:	1mL/min
Temperatura:	30°C
Columna:	LiChroCART® 150-4.6 RP-18e (5µm)
Tiempo de corrida:	15 minutos
Volumen de inyección:	10 µL

Tabla 3.- Gradiente de la fase móvil utilizada en el análisis hecho por HPLC-DAD

Tiempo (min)	Acido fosfórico 0.1% (%)	Acetonitrilo (%)
0	100	0
5	70	30
7	50	50
15	100	0

Preparación de la solución estándar: Se pesó con precisión, alrededor de 50 mg de estándar de rutina, luego se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL, se disolvió y enrasó con metanol y dimetilsulfóxido. Se diluyó 1 mL de esta solución a 50 mL con medio de disolución.

Preparación de la solución muestra: A las fracciones secas obtenidas por el fraccionamiento en columna del extracto acuoso liofilizado de *Hura crepitans* se les agregó 5mL de metanol.

3.10. Bioensayo de toxicidad en *Artemia salina*⁽³⁷⁾

La Artemia salina es un crustáceo sensible a un amplio rango de compuestos con actividad biológica y de muy diversas estructuras químicas, por lo que es usado para pruebas de toxicidad. Ha sido propuesto para la búsqueda de nuevos metabolitos tóxicos y para la determinación de la concentración letal 50 (CL50) o del porcentaje de mortalidad que produce una sustancia, habiéndose determinado una muy buena correlación con las pruebas específicas de citotoxicidad.

- Metodología:
 - Se preparó una solución de agua de mar (3.8 g de sal de mar comercial en 100mL de agua destilada). Se filtró. Se colocó aproximadamente 50

mg de huevos de *Artemia salina* en un erlemeyer con 350 mL de agua de mar.

- Se les situó en una cámara de 2 compartimentos (uno oscuro y el otro iluminado por una lámpara dispuesta a una distancia aproximada de 30 cm) y con una bomba de oxígeno con burbujeo lento.
- Se transfirió la mayor cantidad de nauplios vivos a un erlenmeyer con agua fresca.
- Se pesó 20 mg del extracto acuoso liofilizado de la corteza de *Hura crepitans*.
- Se disolvió 20 mg de la muestra en 2 mL de disolvente, 0.5 mL de DMSO y 1.5 mL de agua destilada (lo que hace un total de 2 mL). A partir de esta solución, se prepararon diluciones de 1000, 100 y 10 ppm transfiriendo a cada vial 500, 50, y 5 µl respectivamente. Siendo 3 viales por cada concentración (9 en total). Se hizo un blanco por muestra. Una vez listos los nauplios para el ensayo, a cada vial se le agregaron 10 nauplios (30 nauplios por dilución) y la dilución del extracto requerido. Luego, se agregó agua de mar hasta completar 5 mL por vial. A cada vial se le agregó además, 1 gota de suspensión de levadura (3 mg de levadura seca se disolvió en 5 mL de agua de mar como alimento).
- Después de 24 horas, se contó y anotó el número de sobrevivientes en cada dilución.
- Se aplicó el ensayo de toxicidad sobre *A. salina* por triplicado a cuatro concentraciones de la corteza de *Hura crepitans* y el blanco. (Figura 7) Se determinó el porcentaje de mortalidad de las larvas. Los datos se analizaron para determinar valores CL50 en la base de datos Probit.



Figura 7.- Muestra trabajada en *Artemia salina* a diferentes concentraciones del extracto liofilizado de *H. crepitans*.

Fuente: UNMSM

3.11. Crianza de los insectos

- ***Bemisia tabaci* (Gennadius) Biotipo B⁽³⁸⁾**

La crianza para estudio de biología y ensayos se efectuaron bajo condiciones ambientales de 21 ± 2 °C y 78% HR

La crianza se inició con la siembra y desarrollo de plantas pequeñas en macetas o bolsas de plástico negras, luego se implementó el ambiente de invernadero, y se infestó con la plaga en cubos de crianza. El procedimiento fue el siguiente:

1. Siembra y desarrollo de plantas de algodón hasta un mes de edad en macetas con un kilogramo de tierra preparada.
2. Construcción de cubos de crianza de 1 m² de cada cara, con bases de aluminio y malla de 400 hilos/ pulg².
3. Recuperación de adultos de mosca blanca en jaulas de vidrio, para infestación inicial.
4. Mantenimiento de plantas con presencia de hojas jóvenes.
5. Implementación del invernadero con piso de gravilla.
6. Lavado de las plantas a presión.

7. Colocación de 20 plantones por cubo de crianza en invernadero
8. Riego en forma abundante.
9. Confinación de aproximadamente 1000 moscas blancas en cada cubo de crianza con 20 plantones, dentro del invernadero.
10. Estudio del ciclo biológico de la mosca blanca.
11. Separación de los estadios biológicos de la mosca blanca por cubo de crianza para ser utilizadas en el ensayo correspondiente.

- ***Aphis gossypii***⁽³⁹⁻⁴¹⁾

La crianza para estudio de biología y ensayos se efectuaron bajo condiciones ambientales de 20 ± 2 C y 72% HR.

La crianza se inició con la siembra y desarrollo de plantas pequeñas en macetas o bolsas de plástico negras, luego se implementó el ambiente de invernadero y se infestó con la plaga en cubos de crianza. El procedimiento fue el siguiente:

1. Siembra y desarrollo de plantas de algodón de tres meses de edad en macetas de un kilogramo de tierra preparada.
2. Construcción de cubos de crianza de 1 m² de cada cara, con bases de aluminio y malla de 400 hilos/ pulg²
3. Recuperación de hembras fundatrices de pulgón del algodón en jaulas de vidrio, para infestación inicial.
4. Mantenimiento de plantas con presencia de hojas jóvenes.
5. Implementación de invernadero con piso de gravilla.
6. Lavado de las plantas a presión.
7. Confinación de 20 plantones por cubo de crianza en invernadero.
8. Riego en forma abundante.
9. Confinación de 100 hembras fundatrices en cada cubo de crianza con 20 plantones, dentro de invernadero.
10. Estudio del ciclo biológico del pulgón del algodón.
11. Mantenimiento de cada cubo con un solo estadio biológico del pulgón para ser utilizadas en el ensayo correspondiente.

3.12. Prueba *in vitro*

- ***Bemisia tabaci* (Gennadius) Biotipo B** ⁽⁴²⁻⁴⁴⁾

Se utilizó el método de aspersión directa para la evaluación de efectividad insecticida de extractos botánicos en *Bemisia tabaci*. El cual consiste en aspersar el extracto directamente sobre las ninfas y la planta de la que se alimentaran mientras dure el experimento, en cantidades que no permitan una muerte mecánica por ahogamiento. Se analizaron los resultados por el método Probit.

- Metodología
- Preparación de los envases

Se utilizaron 24 envases de polipropileno incoloro resistente al calor.

Se lavaron los envases en agua caliente (aproximadamente 80°C) y se secaron en la estufa.

Se limpiaron 24 viales de vidrio con agua potable e hipoclorito de sodio y luego se colocaron en la estufa por 20 minutos.

Se cortaron tiras de algodón hidrofílico de 0.6cm x 2.5cm para hacer torundas alrededor del pecíolo de la hoja a tratar.

- Recolección de los insectos en hojas infestadas.

Se recolectó entre el 110 y 125% de la cantidad necesaria de insectos para los ensayos (mínimo 20 ninfas por cada hoja a evaluar).

Para la selección se usaron lunas de aumento de 10X en el momento de colecta.

Luego de confirmar que las hojas estaban realmente infestadas, fueron cortadas de la planta hospedera y luego llevadas a un envase de plástico con fondo de algodón hidrofílico húmedo, para ser transportadas al laboratorio para su posterior análisis.

- Tratamiento de las hojas infestadas previo al ensayo

Se lavaron las hojas infestadas y fueron sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio por 3 segundos cada una.

A cada hoja se le hizo un recuento de las ninfas retirando con la ayuda de una aguja las ninfas en exceso, luego se anotaron los datos. Se verificó la obtención de la cantidad necesaria de ninfas.

Se analizaron las ninfas grandes y las ninfas pequeñas por separado.

Para realizar el conteo se utilizó un estereoscopio de 20 X de aumento.

Se colocó el algodón en el peciolo de las hojas y éstas a su vez se colocaron en los viales de vidrio, los cuales estuvieron llenos con agua.

- Implementación del ensayo

El ensayo se realizó por aspersión de la sustancia a investigar en el envés de la hoja infestada a 4 concentraciones distintas con 3 repeticiones, 1 blanco y 1 control positivo (Rotebiol).

En los envases de polipropileno se colocó papel toalla en la base, luego se colocaron los viales con las hojas infestadas y se taparon los envases con poliseda blanca enmallada, y una banda elástica.

Para el control se siguió el mismo procedimiento pero solo se utilizó agua destilada.

- Evaluación

Se realizaron lecturas visuales con ayuda de un estereoscopio en primera instancia y con la ayuda del estilete entomológico, se confirmó si los insectos estaban vivos o muertos.

La evaluación fue diaria para los primeros 5 días e interdiaria los días subsiguientes hasta los 15 días de iniciado el ensayo (desde el momento que el insecto toma contacto con el extracto acuoso).

Se consideraron como vivas todas aquellas ninfas que manifestaron cualquier tipo de movimiento ya sea normal o aletargado casi moribundo durante 15 segundos de observación a la lupa.

- ***Aphis gossypii***⁽⁴⁵⁾

Se utilizó el método de contacto directo para áfidos de la FAO (Mejía 1990), adaptado por Da Silva Correa en el 2006, para la evaluación de efectividad insecticida de extractos botánicos en *Aphis gossypii* Glover. El cual consiste en aspersar el extracto directamente sobre los áfidos y la planta de la que se alimentaran mientras dure el experimento, en cantidades que no permitan una muerte mecánica por ahogamiento. Se analizaron los resultados por el método Probit.

- Metodología
- Preparación de los envases

Se utilizaron 14 envases de polipropileno incoloro resistente al calor.

Se lavaron los envases en agua caliente (aproximadamente 80°C) y se secaron en la estufa.

- Recolecta y transporte de pulgones

Se recolectó entre el 110 y 125% de la cantidad necesaria de pulgones para el ensayo.

Los pulgones fueron recolectados con un pincel, colocándolos en un envase descartable de polietileno de 1L de capacidad, acondicionado con hojas de algodón.

Se realizaron pequeños agujeros a la tapa del envase para que respiren los pulgones.

- Recolección y tratamiento de las hojas de algodón

Se calculó la cantidad de hojas para el ensayo en función del número de envases a utilizar.

Se lavaron las hojas con agua corriente primero y luego se desinfectaron con etanol de 70 o 96%, utilizando para esto algodón necesario.

Se secaron las hojas, se recortaron en forma de cuadrado, tamaño: 2.5 de largo x 2 cm de ancho y se almacenaron en un recipiente descartable de polietileno con tapa, para evitar que se contamine, hasta el momento del ensayo.

– Implementación del ensayo

El ensayo se realizó por aspersión de la sustancia a investigar en el envés de la hoja infestada a 4 concentraciones distintas con 3 repeticiones, 1 blanco y 1 control positivo (Rotebiol).

Se colocó un corte de hoja fresca en el centro de cada envase descartable.

Se colocaron 10 pulgones adultos sobre la hoja de cada envase.

Se aplicó mediante el aspersor, una dosis sobre los pulgones y sobre la hoja.

– Evaluación

Se tomó cada envase y se verificó a trasluz que no haya pulgones entre la tapa y el envase.

Se contaron los pulgones muertos y se tomó registro de ellos.

3.13 Prueba de campo

- **Descripción del campo**

Identificación y extensión: El cultivo en el cual se realizó el experimento fue el algodón de la especie *Gossypium barbadense* variedad Tangüis, en un área total de 280 m² de extensión, dividida en 20 parcelas.

Ubicación geográfica: El Campo experimental está ubicado en El Centro Experimental La Molina, provincia de Lima, departamento de Lima,

instalación perteneciente al Instituto Nacional de Innovación Agraria INIA, latitud sur: 12° 4' 24" longitud oeste: 76° 56' 10", altura (m.s.n.m.): 241, temperatura: 27°C, orientación del aire: noroeste a sureste.

- **Diseño e instalación del experimento**

Parcelas experimentales: En los 280 m² del cultivo de algodón se delimitaron parcelas experimentales que tuvieron las siguientes dimensiones:

Longitud:	10.0 m
Ancho:	1.4 m.
Área de parcela:	14.0 m ² .
Número de repeticiones:	4 repeticiones
Número de tratamientos	5 tratamientos (de los cuales sólo 3 eran concernientes al presente estudio)
Número total de parcelas	20.0 parcelas
Área total:	280.0 m ² .

Tratamientos empleados: Para la presente tesis, los tratamientos fueron:

TB: *Hura crepitans* "catahua"

TD: Rotenol - control positivo o testigo comercial.

TE: Agua - control negativo o testigo sin aplicar.

Plagas observadas:

Pulgón del algodón - *Aphis gossypii*

Mosca blanca - *Bemisia tabaci* (Gennadius) Biotipo B

Diseño experimental: El experimento de investigación fue realizado siguiendo un diseño de bloques completamente al azar (DBCA), con las 20 parcelas distribuidas como se muestra en la siguiente figura:

TE	TD		TB
TD		TB	
	TB		TE
TB		TE	TD
	TE	TD	
BLOQUE I	BLOQUE II	BLOQUE III	BLOQUE IV

Figura 8. Distribución de los tratamientos en campo

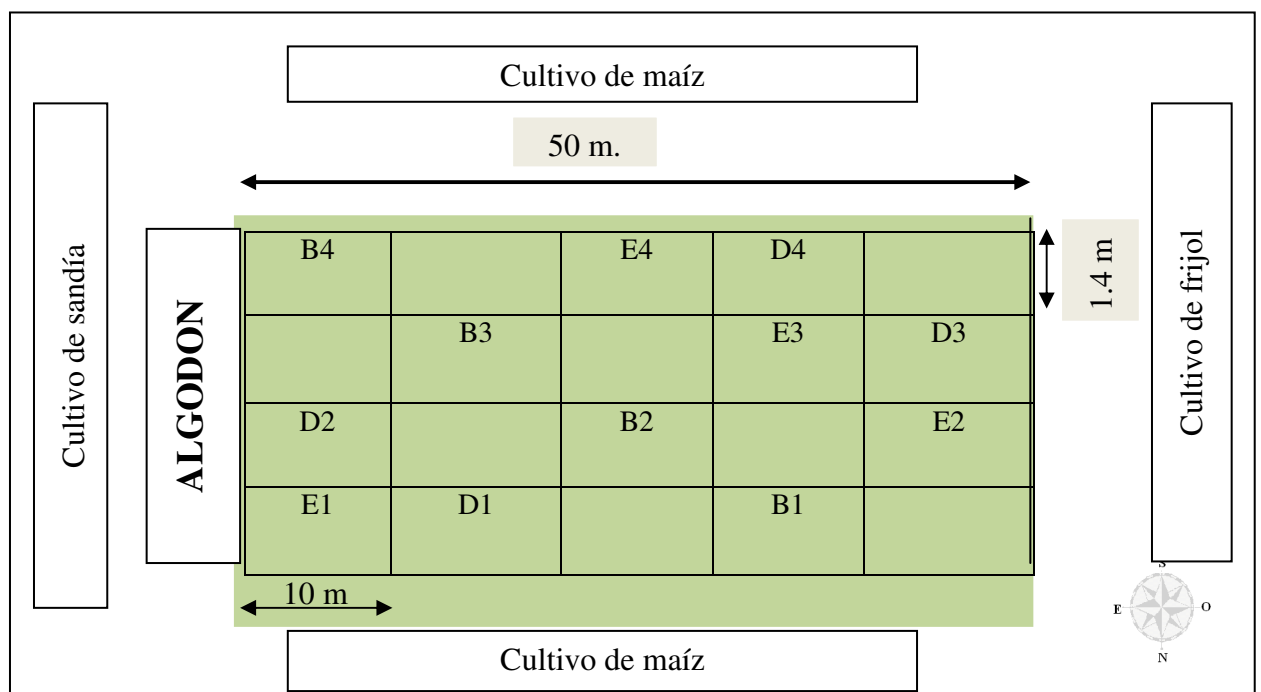


Figura 9.- Croquis y distribución de los tratamientos en campo

- **Metodología de aplicación de los tratamientos**

- Particularidades del cultivo

El cultivo experimental fue instalado con 1.40 m. de distancia entre surcos, a diferencia de los algodones comerciales que poseen un

distanciamiento de 1 m, lo que permitió un buen desplazamiento de los aplicadores en los tratamientos.

Es importante resaltar el hecho de que el cultivo experimental no fue aplicado con productos químicos para el control de plagas durante toda la campaña, como sucede en condiciones normales de producción comercial, a la edad de la planta, tienen como mínimo 6 aplicaciones. Es por esta razón que los biocidas no llegaron a competir, anular o disminuir su acción con algún insecticida de síntesis.

– Particularidades de las aplicaciones en campo

Las aplicaciones se realizaron con la mayor precaución posible, con una mochila manual de 20 litros de capacidad, con la boquilla de la mochila invertida de abajo hacia arriba y dirigida al envés de las hojas donde se encuentran las plagas a controlar.

Para evitar el efecto de borde no se aplicó la parte que colindaba con los cultivos de maíz, por lo que solamente se aplicaron y marcaron las hojas de sólo un lado del surco.

Las parcelas experimentales no fueron aisladas con borde de plástico, porque no impediría por completo las migraciones de la mosca blanca.

– Inicio y aplicación de los tratamientos en campo

Inicio del Experimento

El experimento se instaló el 06 de abril de 2010

Productos a ensayarse:

Para los Tratamientos: *Hura crepitans* “catahua”

Producto de referencia: Rotebiol.

Tipo de aplicación y equipo utilizado

Terrestre, con mochila manual de 20 L.

Momento y frecuencia de aplicación:

Se realizaron dos aplicaciones, el día 06 de abril y 20 de abril del 2010.

Dosis y volúmenes de aplicación

Todas las aplicaciones se realizaron previa calibración para determinar el gasto de agua, en total el promedio de gasto fue de 7 L. de la mezcla por cada tratamiento.

Las dosis ensayadas se observan en la tabla 4.

Tabla 4.- Tratamientos empleados en el ensayo de eficacia de plantas biocidas

Tratamiento. biocida	g / L. del Producto	Dosis/cilindro 200 L	Dosis / Tratamiento
T B CATAHUA	2.85	250 g	20 g.
T D ROTEBIOL	1.25	250 g	8.75 mL
T E Testigo sin aplicar	Ninguno	-----	-----

Para el caso de catahua que era 20 gramos del producto a aplicar, se mezcló con 20mL de un aceite vegetal que actúa como encapsulador (Wett'Oil), para que los productos tengan una mayor acción como insecticidas luego, se adicionó 5mL de un acidificante, para regular el pH y se completó con agua destilada hasta llegar a los 7 L. Para el caso de Rotebiol, se mezcló los 8.75mL del producto con 8.75mL del encapsulador + 5mL del regulador de pH.

- **Metodología de evaluación, registro y cuantificación**

- Método

Se tomaron 5 plantas de la parte central y se marcaron con rafia 5 hojas por planta y 25 hojas por parcela, en cada hoja se contaron el número de insectos por hoja y se colocó un valor según el grado de ataque propuesto por Gonzales Bachini.⁽⁴⁶⁾ El marcado de hojas fue realizado para evaluar insectos picadores chupadores (pulgón y mosca blanca), en insectos de poca movilidad como pulgones y ninfas de mosca blanca y sus hábitos biológicos de vida y los coeficientes de variabilidad bajos (menores de 35) validan la metodología.

- Momento y frecuencia de evaluaciones

Las evaluaciones se realizaron antes y después de las aplicaciones, en las siguientes fechas.

Para la primera aplicación

Se evaluaron pulgones y adultos de mosca blanca.

Para la segunda aplicación

Se evaluaron ninfas y adultos de mosca blanca.

Tabla 5.- Calendario del mes de abril del 2010 con las fechas de las aplicaciones y evaluaciones

Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo
			1	2	3	4
5 Primera evaluación	6 Aplicación 1	7	8 Segunda evaluación	9	10	11
12 Tercera evaluación	13	14	15	16 Cuarta evaluación	17	18
19 Primera evaluación	20 Aplicación 2	21	22 Segunda evaluación	23	24	25
26 Tercera evaluación	27	28	29	30 Cuarta evaluación		

- Análisis de los datos

Los datos fueron analizados utilizando el método ANVA del programa SAS.

IV. RESULTADOS

4.1 Screening fitoquímico

El rendimiento del extracto liofilizado fue de 12.38%. Los resultados del screening fitoquímico realizado en el liofilizado del extracto acuoso de la corteza de catahua son los siguientes:

Tabla 6.- Resultados del screening fitoquímico

Metabolito Secundario	Reactivo	Resultado
Alcaloides	Dragendorff	-
Flavonoides	Shinoda	+++
Saponinas	Prueba afrosimétrica	+++
Taninos	Tricloruro de hierro	-
Esteroides y/o triterpenos	Liebermann-Buchard	+
Otros compuestos fenólicos	Tricloruro de hierro	++

Leyenda:

(-) No detectable.

(+) Poco o escaso.

(++) Moderado

(+++) Abundante

4.2. Análisis cromatográfico

La cromatografía en capa fina realizada a la muestra del extracto acuoso liofilizado de la corteza de *Hura crepitans* por duplicado usando como solvente metanol y agua obtuvo el siguiente cromatograma:

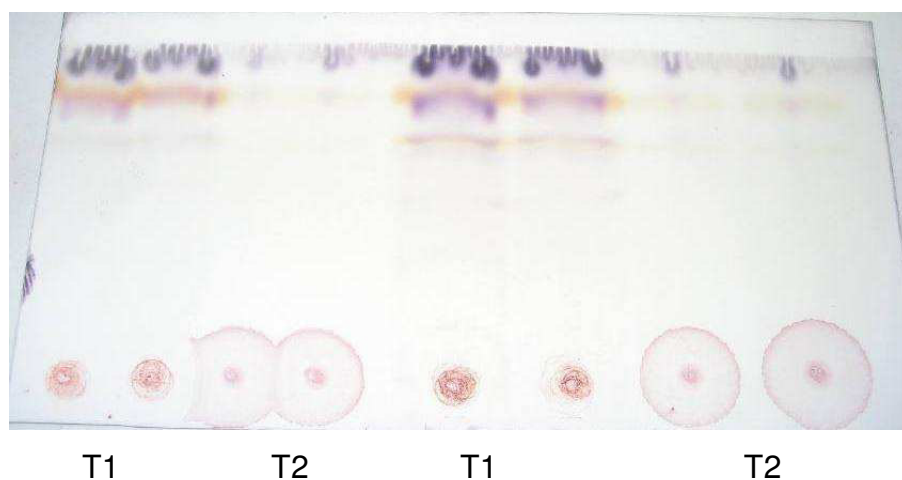


Figura 10.- Perfil cromatográfico del extracto acuoso liofilizado de la corteza de *Hura crepitans*. Donde: T1: muestra disuelta en metanol y T2: muestra disuelta en agua

4.3. Perfil espectrofotométrico

El extracto acuoso liofilizado de la corteza de *Hura crepitans* disuelto en éter dimetílico, alcohol metílico y propilenglicol obtuvo los siguientes perfiles espectrofotométricos:

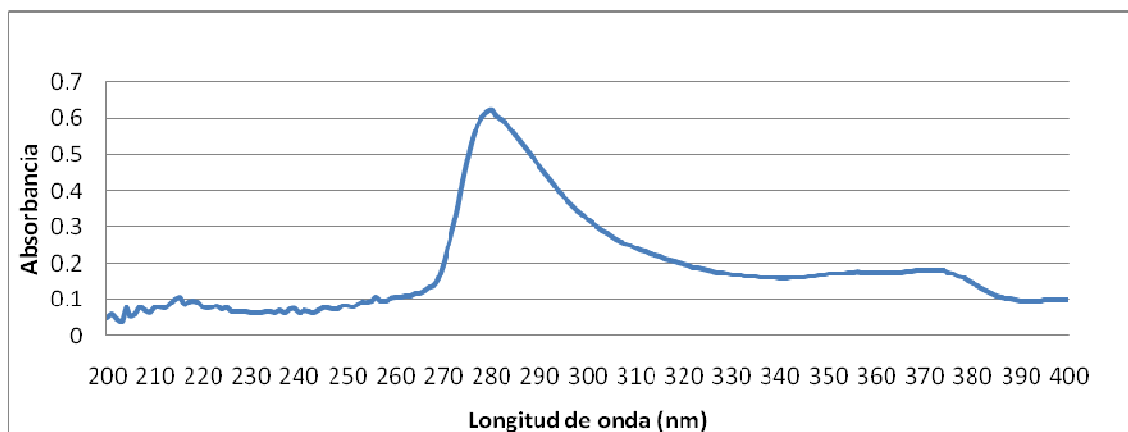


Figura 11.- Espectro UV de la muestra disuelta en éter dimetílico

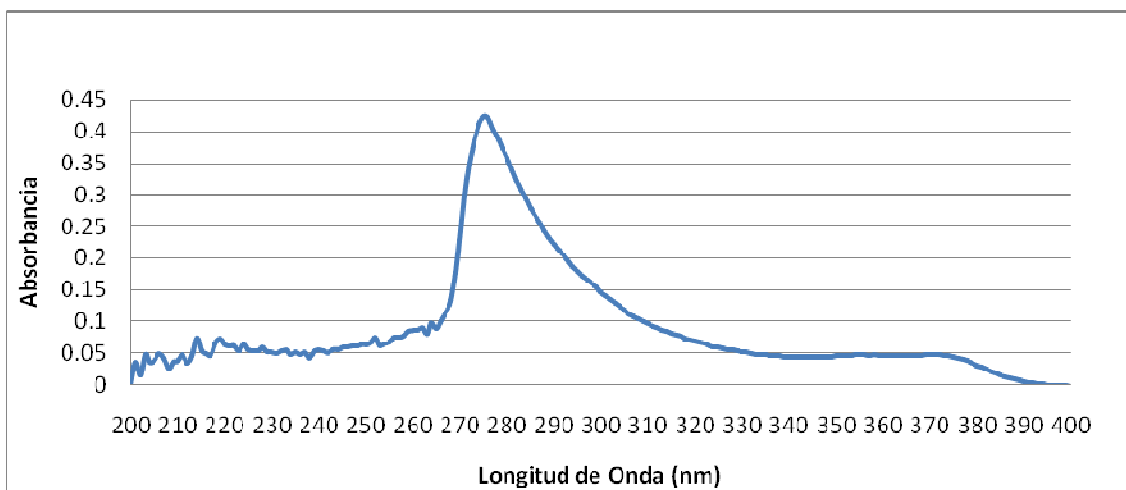


Figura 12.- Espectro UV de la muestra disuelta en metanol

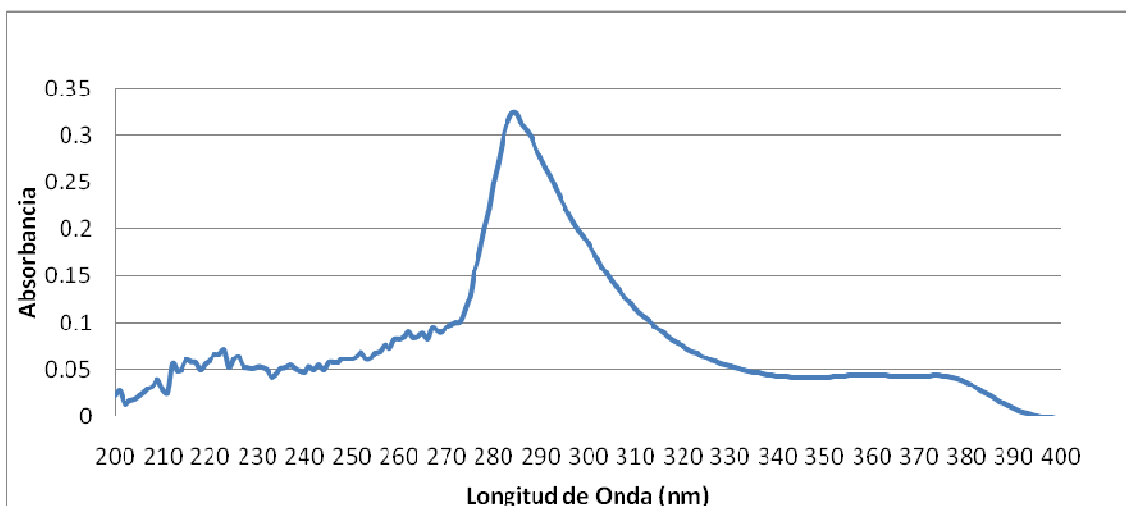


Figura 13.- Espectro UV de la muestra disuelta en propilénglicol

4.4. Determinación UV de metabolitos

En la cromatografía en papel realizada según el método descrito por Mabry T. et al. se observaron 9 bandas en luz UV de las cuales la banda 2 dió positivo a la prueba de identificación de flavonoides (reactivo de Shinoda). El espectro descrito a continuación pertenece a dicha banda:

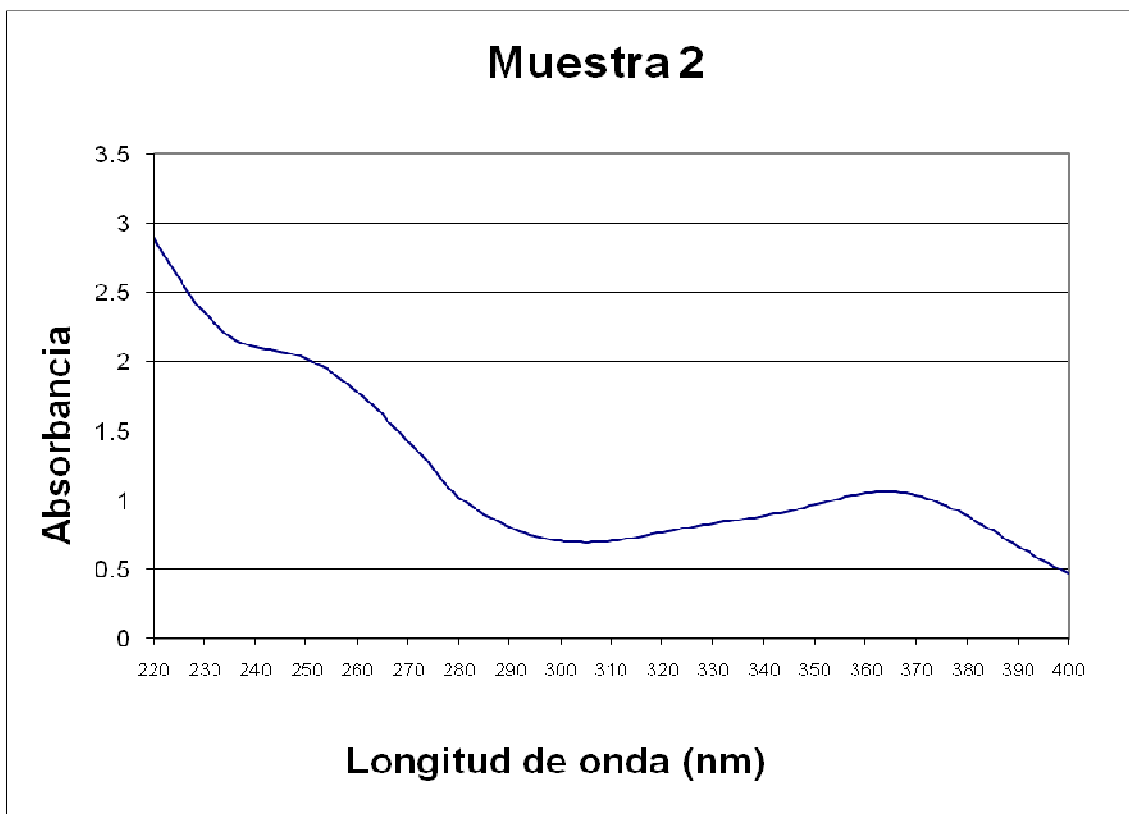


Figura 14.- Espectro UV de la muestra 2

4.5. Cuantificación de metabolitos

Flavonoides: 21.82835 mg expresado en catequina/g de liofilizado.

Fenoles totales: 62.12 mg expresado en fluoroglucinol/g de liofilizado.

4.6. Análisis por HPLC

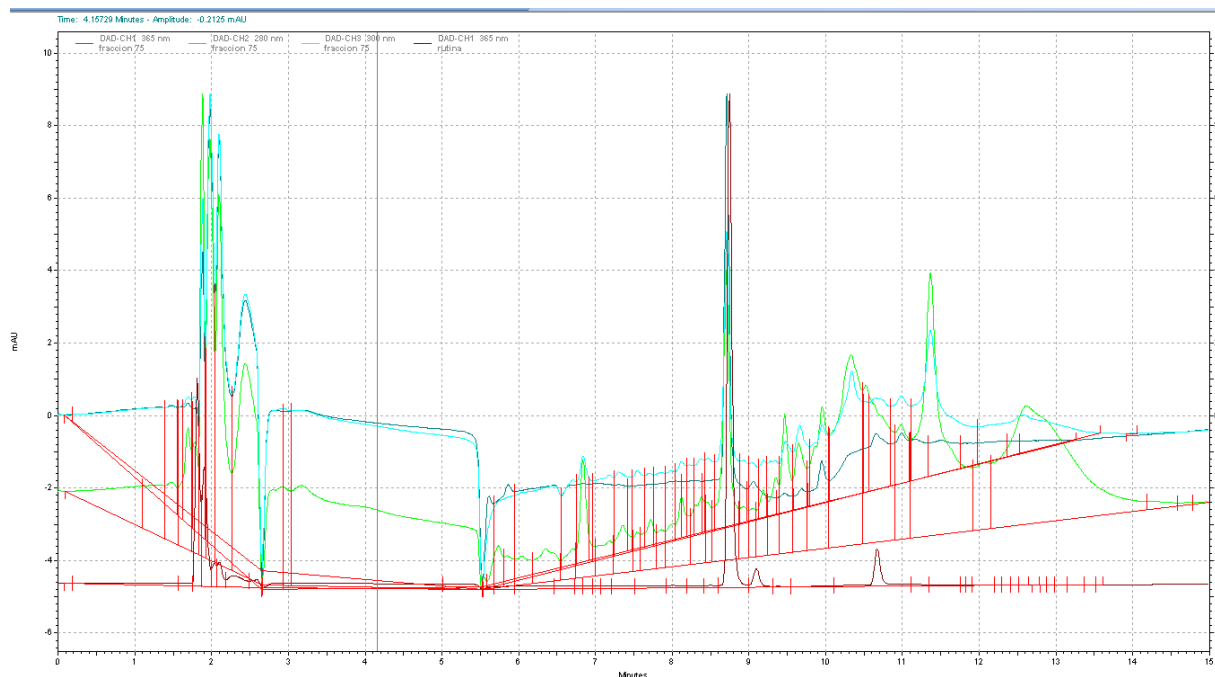


Figura 15.- Cromatograma de la fracción 75 a longitudes de onda de 285nm, 300nm y 365nm obtenida por fraccionamiento en columna del liofilizado acuoso de la corteza de *Hura crepitans* comparado con el estándar del flavonoide rutina

4.7. Bioensayo de toxicidad en *Artemia salina*

Tabla 7.- Dosis Letal 50% (CL50) del liofilizado de corteza de *Hura crepitans* sobre *Artemia salina* a las 24 horas de exposición, calculado por el método de Probit

Concentración (µg/mL)	Mortalidad (%)
10	46.6666667
100	60
500	100
1000	100
CL50 = 19.547 µg/mL	

4.8. Prueba *in vitro*

- ***Bemisia tabaci* (Gennadius) Biotipo B**

Tabla 8.- Resultados del porcentaje de mortalidad de la prueba *in vitro* del liofilizado de corteza de *Hura crepitans* sobre ninfas pequeñas de *Bemisia tabaci*

Concentración mg/mL	Mortalidad (%)									
	Tiempo (Horas)									
	12	24	36	48	60	84	108	132	156	180
1	1.666667	1.666667	5	5	8.3333	10	10	13.333	15	15
2.85	5	5	6.6667	8.333	10	11.67	13.33	15	16.6667	16.67
25	6.666667	6.66667	8.3333	8.333	10	15	16.67	16.667	20	20
50	8.333333	8.33333	10	10	13.333	16.67	18.33	18.333	21.6667	21.67
Rotebiol	10	10	15	15	15	20	20	20	25	25

Tabla 9.- Dosis Letal 50% (CL50) del liofilizado de corteza de *Hura crepitans* sobre ninfas pequeñas de *Bemisia tabaci* a las 180 horas de exposición, calculado por el método de Probit

Concentración (mg/mL)	Mortalidad (%)
1	15
2.85	16.67
25	20
50	21.67
CL50 = > 1000	

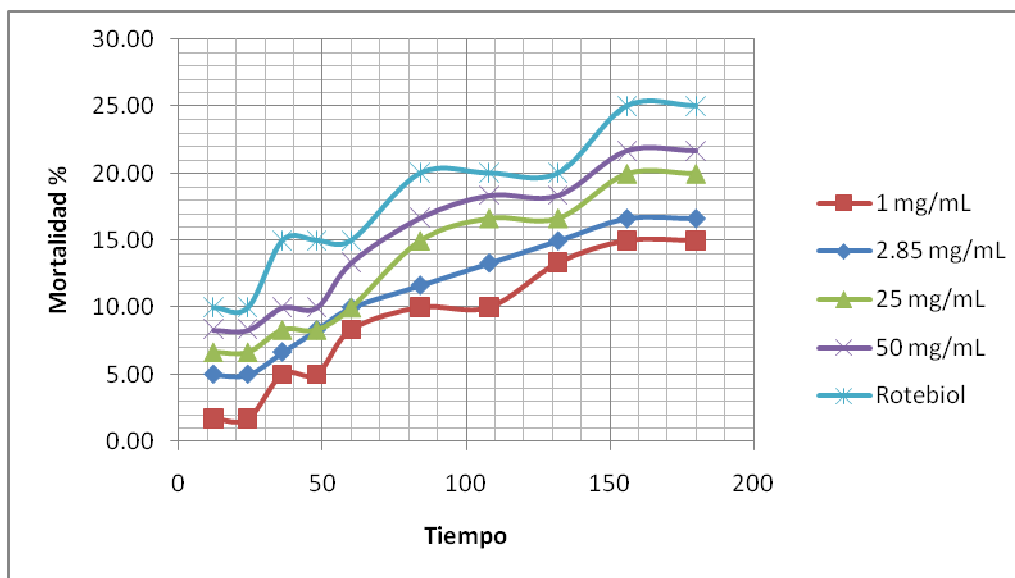


Figura 16.- Resultados del porcentaje de mortalidad de la prueba *in vitro* del liofilizado de corteza de *Hura crepitans* sobre ninfas pequeñas de *Bemisia tabaci*

Tabla 10.- Resultados del porcentaje de mortalidad de la prueba *in vitro* del liofilizado de corteza de *Hura crepitans* sobre ninfas grandes de *Bemisia tabaci*

Concentración mg/mL	Mortalidad (%)									
	Tiempo (Horas)									
	12	24	36	48	60	84	108	132	156	180
1	0	0	0	3.3333	5	5	5	5	6.667	6.6667
2.85	0	0	0	5	5	5	5	5	8.333	8.3333
25	0	0	1.6666667	5	10	10	11.67	13.333	13.33	13.333
50	5	8.33333	8.3333333	10	13.3333	15	15	15	18.33	20
Rotebiol	10	15	15	15	15	20	20	20	20	20

Tabla 11.- Dosis Letal 50% (CL50) del liofilizado de corteza de *Hura crepitans* sobre ninfas grandes de *Bemisia tabaci* a las 180 horas de exposición, calculado por el método de Probit

Concentración (mg/mL)	Mortalidad (%)
1	6.6667
2.85	8.333
25	13.3333
50	20
CL50 = > 1000	

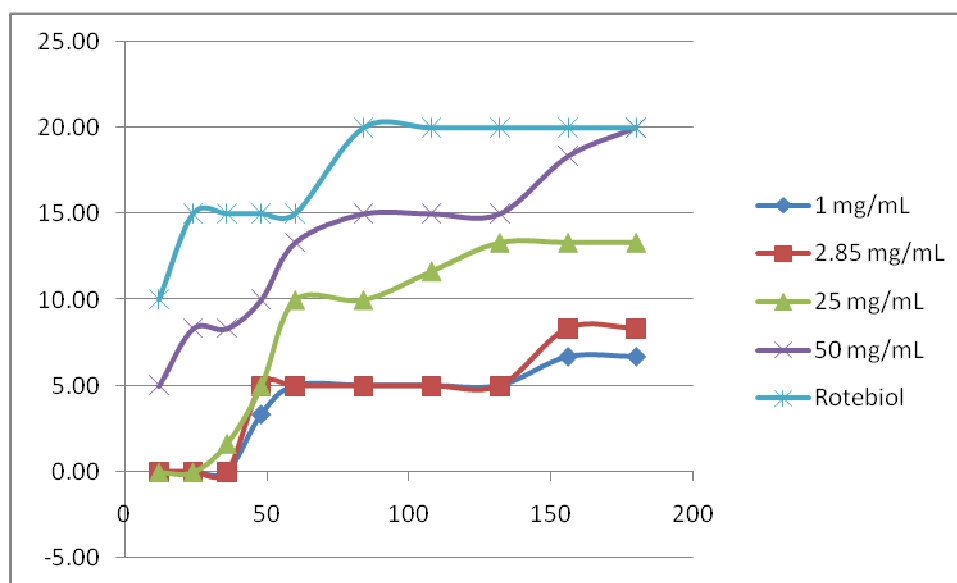


Figura 17.- Resultados del porcentaje de mortalidad de la prueba *in vitro* del liofilizado de corteza de *Hura crepitans* sobre ninfas grandes de *Bemisia tabaci*

- ***Aphis gossypii***

Tabla 12.- Resultados del porcentaje de mortalidad de la prueba *in vitro* del liofilizado de corteza de *Hura crepitans* sobre adultos de *Aphis gossypii*

Concentración mg/mL	Mortalidad (%)					
	Tiempo (Horas)					
	12	24	36	48	60	72
1	33.333333	40	43.33333	40	50	56.6667
2.85	30	53.3333	53.33333	53.333	63.333333	66.6667
25	40	53.3333	60	60	66.666667	66.6667
50	40	60	66.66667	63.333	70	76.6667
Rotebiol	60	70	70	60	70	80

Tabla 13.- Dosis Letal 50% (CL50) del liofilizado de corteza de *Hura crepitans* sobre adultos de *Aphis gossypii*, calculado por el método de Probit

Concentración (mg/mL)	Mortalidad (%)
1	56.6667
2.85	66.6667
25	66.6667
50	76.6667
CL50 = 0.156	

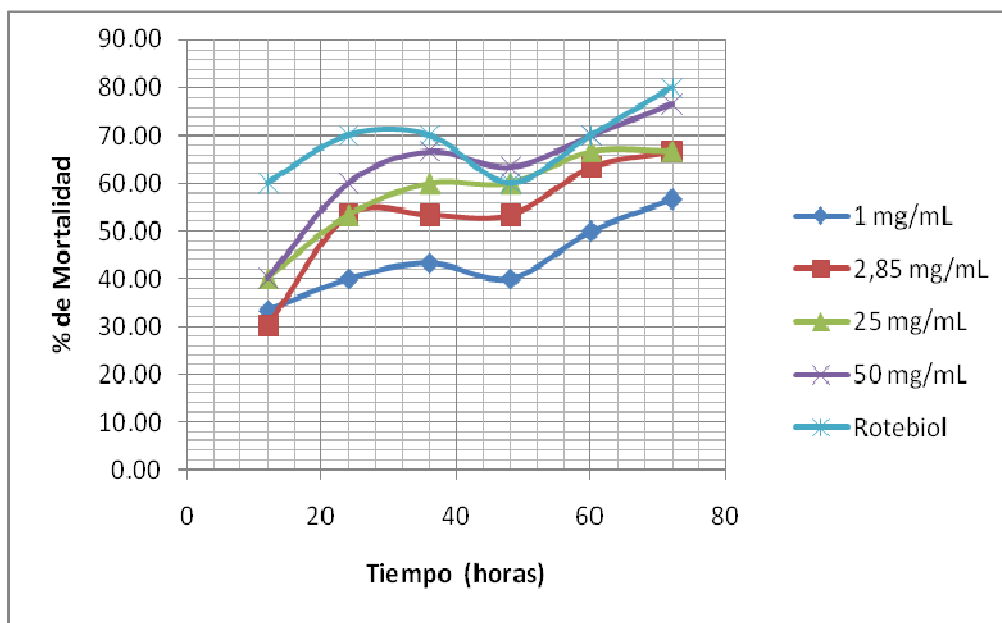


Figura 18.- Resultados del porcentaje de mortalidad de la prueba *in vitro* del liofilizado de corteza de *Hura crepitans* sobre adultos de *Aphis gossypii*

4.9. Prueba de campo

- Estado fitosanitario del campo

El campo se encontraba atacado por tres plagas: pulgón (*Aphis gossypii*), mosca blanca (*Bemisia tabaci*) y arrebatiado (*Dysdercus peruvianus*).

Los resultados de las evaluaciones de campo se presentan en las siguientes tablas:

Tabla 14.- Grado de ataque de pulgones y adultos de mosca blanca por hoja de la primera aplicación

TRAT	REP	PULG ANT	PULG 2DD	PULG 6DD	PULG 10DD	MB ANT	MB 2DD	MB 6DD	MB 10DD
B	1	4.36	2.84	2.16	1.68	2.56	3.16	3.28	3.72
D	1	5.04	4.20	2.88	1.76	4.2	3.16	4.12	4.40
E	1	4.24	4.64	4.12	3.64	4.96	5.56	5.56	5.44
B	2	4.28	2.84	2.12	1.60	2.92	2.80	3.32	3.88
D	2	5.36	2.84	2.12	1.80	4.88	4.92	4.96	5.08
E	2	4.04	4.24	3.56	2.88	2.36	2.80	2.96	3.04
B	3	5.40	3.40	2.64	1.84	3.20	2.64	2.92	3.64
D	3	2.68	1.64	1.44	1.28	3.08	2.48	3.32	3.88
E	3	4.08	4.20	3.20	2.72	3.24	3.84	4.08	4.28
B	4	4.52	2.60	1.80	1.72	3.64	3.76	3.68	3.72
D	4	5.32	3.04	2.24	1.68	2.68	2.80	3.96	4.16
E	4	5.40	4.68	3.84	2.84	3.84	4.44	4.64	4.72

Leyenda:

TRAT: Tratamientos

REP: Repeticiones

PULG: Pulgón

MB: Adulto de mosca blanca

ANT: Antes de la aplicación

DD: Días después de la aplicación

Tabla 15.- Grado de ataque de ninfas y adultos de mosca blanca por hoja de la segunda aplicación

TRAT	REP	NMANT	NM2DD	NM6DD	NM10DD	AMANT	AM2DD	AM6DD	AM10DD
B	1	3.64	3.80	4.04	4.76	4.08	4.36	4.64	6.00
D	1	2.64	3.08	3.56	4.80	4.52	4.68	4.92	5.44
E	1	3.08	3.36	4.16	5.56	5.20	5.28	5.48	6.00
B	2	2.84	3.20	3.92	4.68	4.16	4.36	4.68	5.72
D	2	3.88	4.00	4.40	5.00	4.96	5.08	5.52	5.92
E	2	2.92	3.28	3.8	4.60	3.76	4.16	4.60	5.52
B	3	3.56	3.84	4.24	4.72	4.12	4.44	5.04	5.60
D	3	3.12	3.44	4.04	4.84	3.88	4.04	4.88	5.56
E	3	3.92	4.16	4.60	5.28	4.16	4.40	4.80	5.88
B	4	3.64	3.84	4.32	5.08	4.08	4.28	4.72	5.16
D	4	3.76	4.04	4.60	5.32	4.48	4.56	4.80	5.48
E	4	3.84	4.12	4.56	5.56	4.56	4.68	5.04	5.76

Leyenda:

TRAT: Tratamientos

REP: Repeticiones

NM: Ninfas de mosca blanca

AM: Adultos de mosca blanca

ANT: Antes de la aplicación

DD: Días después de la aplicación

Tabla 16.- Cuento de ninfas de *Bemisia tabaci* “mosca blanca” al 6 de mayo del 2010

	B1	B2	B3	B4
HOJA PEQUEÑA	15 hojas	14 hojas	20 hojas	23 hojas
Ninfas vivas I	8	9	9	9
N. muertas I	2	2	2	2
Ninfas vivas II	4	6	5	7
N. muertas II	2	3	0	2
N. emergidas II	1	2	0	1
HOJA MEDIANA	16 hojas	8 hojas	10 hojas	6 hojas
Ninfas vivas I	14	6	10	6
N. muertas I	2	3	3	0
Ninfas vivas II	12	5	4	7
N. muertas II	1	2	1	1
N. emergidas II	2	1	1	1
HOJA GRANDE	15 hojas	18 hojas	10 hojas	11 hojas
Ninfas vivas I	9	12	9	6
N. muertas I	2	3	1	1
Ninfas vivas II	5	7	5	2
N. muertas II	1	3	1	0
N. emergidas II	2	1	1	0
	D1	D2	D3	D4
HOJA PEQUEÑA	22 hojas	8 hojas	15 hojas	18 hojas
Ninfas vivas I	13	11	9	11
N. muertas I	2	5	1	2
Ninfas vivas II	11	8	3	8
N. muertas II	2	4	0	1
N. emergidas II	3	3	0	2
HOJA MEDIANA	11 hojas	26 hojas	10 hojas	19 hojas
Ninfas vivas I	12	11	8	13
N. muertas I	3	1	0	1

Ninfas vivas II	10	5	5	9
N. muertas II	1	3	0	1
N. emergidas II	3	1	0	2
HOJA GRANDE	7 hojas	6 hojas	15 hojas	3
Ninfas vivas I	10	12	3	9
N. muertas I	2	5	0	2
Ninfas vivas II	12	8	3	6
N. muertas II	3	4	0	3
N. emergidas II	3	2	0	1
	E1	E2	E3	E4
HOJA PEQUEÑA	25 hojas	10 hojas	25 hojas	15 hojas
Ninfas vivas I	15	10	7	13
N. muertas I	3	3	2	1
Ninfas vivas II	9	4	4	5
N. muertas II	3	1	0	0
N. emergidas II	2	1	0	0
HOJA MEDIANA	10 hojas	24 hojas	13 hojas	15 hojas
Ninfas vivas I	13	9	8	12
N. muertas I	2	2	1	1
Ninfas vivas II	10	6	5	7
N. muertas II	1	3	1	0
N. emergidas II	2	1	1	0
HOJA GRANDE	5 hojas	6 hojas	12 hojas	10 hojas
Ninfas vivas I	17	6	8	19
N. muertas I	4	1	1	1
Ninfas vivas II	10	5	6	2
N. muertas II	2	2	0	0
N. emergidas II	1	1	1	0

- **Resultados de la primera aplicación**

- *Aphis gossypii*

Tabla 17.- Primera evaluación

PULGÓN ANTES DE LA APLICACIÓN		
TRATAMIENTO	Promedio	Duncan
B	4.64	A
D	4.60	A
E	4.44	A

ANVA

ns

C. V. = 20

n.s. = Sin diferencia significativa.

** = Altamente significativa

Tabla 18.- Segunda evaluación

PULGÓN 2 DÍAS DESPUÉS DE LA APLICACIÓN		
TRATAMIENTO	Promedio	Duncan
E	4.44	A
D	2.93	B
B	2.92	B

ANVA

**

C.V. = 24.5

n.s. = Sin diferencia significativa.

** = Altamente significativa

Tabla 19.- Tercera evaluación

PULGÓN 6 DÍAS DESPUÉS DE LA APLICACIÓN		
TRATAMIENTO	Promedio	Duncan
E	3.68	A
B	2.18	B
D	2.17	B

ANVA

**

C.V. =21

n.s. = Sin diferencia significativa.

** = Altamente significativa

Tabla 20.- Cuarta evaluación

PULGÓN 10 DÍAS DESPUÉS DE LA APLICACIÓN		
TRATAMIENTO	Promedio	Duncan
E	3.02	A
B	1.67	B
D	1.63	B

ANVA

**

C.V. =18.7

n.s. = Sin diferencia significativa.

** = Altamente significativa

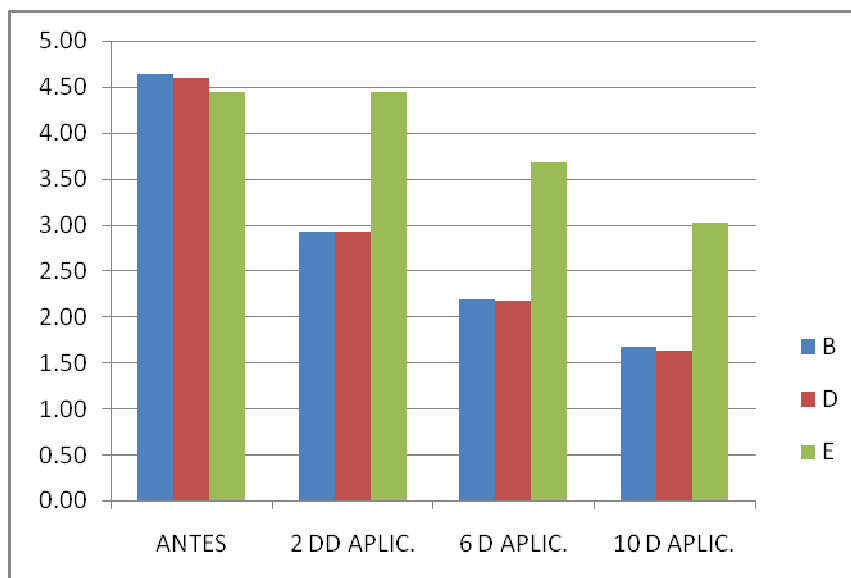


Figura 19.- Distribución de la población de *Aphis gossypii*

- **Adultos de *Bemisia tabaci* (Gennadius) Biotipo B**

Tabla 21.- Primera. evaluación

MOSCA BLANCA ANTES DE LA APLICACIÓN		
TRATAMIENTO	Promedio	Duncan
D	3.71	A
E	3.60	A
B	3.08	A

ANVA

n.s.

C. V. = 28

n.s. = Sin diferencia significativa.

** = Altamente significativa

Tabla 22.- Segunda evaluación

MOSCA BLANCA 2 DÍAS DESPUÉS DE LA APLICACIÓN		
TRATAMIENTO	Promedio	Duncan
E	4.16	A
D	3.34	A
B	3.09	A

ANVA

n.s.

C. V. = 25.8

n.s. = Sin diferencia significativa.

** = Altamente significativa

Tabla 23.- Tercera evaluación

MOSCA BLANCA 6 DÍAS DESPUÉS DE LA APLICACIÓN		
TRATAMIENTO	Promedio	Duncan
E	4.31	A
D	4.09	A
B	3.30	A

ANVA

n.s.

C. V. = 21

n.s. = Sin diferencia significativa.

** = Altamente significativa

Tabla 24.- Cuarta evaluación

MOSCA BLANCA 10 DÍAS DESPUÉS DE LA APLICACIÓN		
TRATAMIENTO	Promedio	Duncan
D	4.38	A
E	4.37	A
B	3.74	A

ANVA

n.s.

n.s. = Sin diferencia significativa.

** = Altamente significativa

C.V. = 16

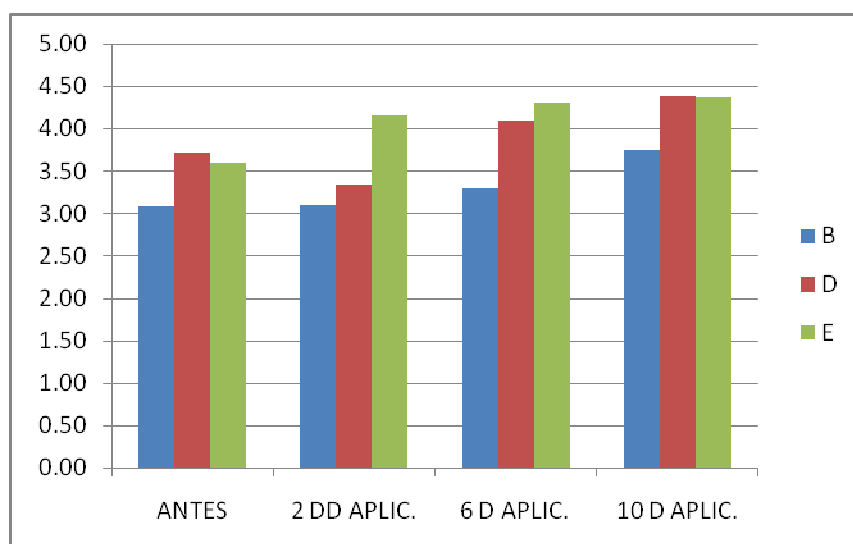


Figura 20.- Distribución de la Población de adultos de *Bemisia tabaci*

- **Resultados de la segunda aplicación**

- **Ninfas de *Bemisia tabaci* (Gennadius) Biotipo B**

Tabla 25.- Primera evaluación

NINFAS DE MOSCA BLANCA ANTES DE LA APLICACIÓN		
TRATAMIENTO	Promedio	Duncan
E	3.44	A
B	3.42	A
D	3.35	A

ANVA n.s.

C. V. = 12.2

n.s. = Sin diferencia significativa.

** = Altamente significativa

Tabla 26.- Segunda evaluación

NINFAS MOSCA BLANCA 2 DÍAS DESPUÉS DE LA APLICACIÓN		
TRATAMIENTO	Promedio	Duncan
E	3.73	A
B	3.67	A
D	3.64	A

ANVA n.s.

C. V. = 9.2

n.s. = Sin diferencia significativa.

** = Altamente significativa

Tabla 27.- Tercera evaluación

NINFAS MOSCA BLANCA 6 DÍAS DESPUÉS DE LA APLICACIÓN		
TRATAMIENTO	Promedio	Duncan
E	4.28	A
D	4.15	A
B	4.13	A

ANVA n.s.

C.V. = 7

n.s. = Sin diferencia significativa.

** = Altamente significativa

Tabla 28.- Cuarta evaluación

NINFAS MOSCA BLANCA 10 DÍAS DESPUÉS DE LA APLICACIÓN		
TRATAMIENTO	Promedio	Duncan
E	5.25	A
D	4.99	A
B	4.81	A

ANVA n.s.

C. V. = 5.3

n.s. = Sin diferencia significativa.

** = Altamente significativa

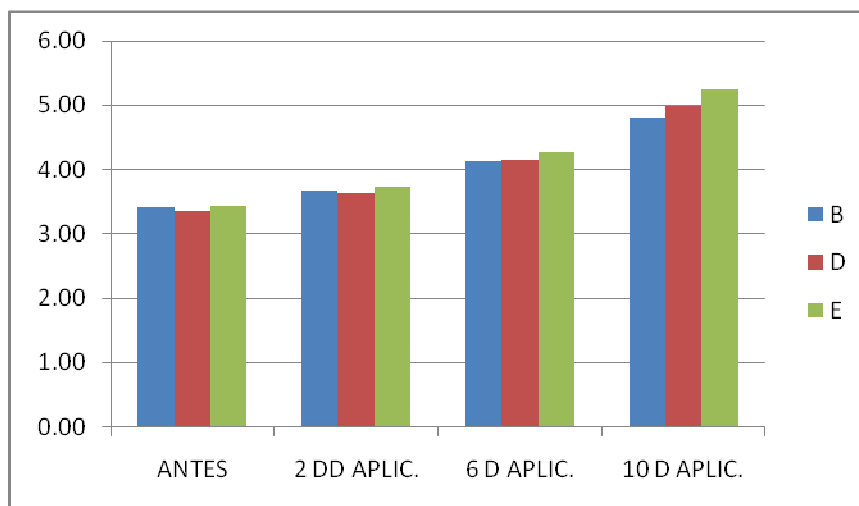


Figura 21.- Distribución de la población de ninfas de *Bemisia tabaci*

– **Adultos de *Bemisia tabaci* (Gennadius) Biotipo B**

Tabla 29.- Primera evaluación

MOSCA BLANCA ANTES DE LA APLICACIÓN		
TRATAMIENTO	Promedio	Duncan
D	4.46	A
E	4.42	A
B	4.11	A

ANVA

n.s.

C. V. = 8.81

n.s. = Sin diferencia significativa.

** = Altamente significativa

Tabla 30.- Segunda evaluación

MOSCA BLANCA 2 DÍAS DESPUÉS DE LA APLICACIÓN		
TRATAMIENTO	Promedio	Duncan
E	4.63	A
D	4.59	A
B	4.36	A

ANVA n.s.

C. V. = 7.51

n.s. = Sin diferencia significativa.

** = Altamente significativa

Tabla 31.- Tercera evaluación

MOSCA BLANCA 6 DÍAS DESPUÉS DE LA APLICACIÓN		
TRATAMIENTO	Promedio	Duncan
D	5.03	A
E	4.98	A
B	4.77	A

ANVA n.s.

C. V. = 6.11

n.s. = Sin diferencia significativa.

** = Altamente significativa

Tabla 32.- Cuarta evaluación

MOSCA BLANCA 10 DÍAS DESPUÉS DE LA APLICACIÓN		
TRATAMIENTO	Promedio	Duncan
E	5.79	A
B	5.62	A
D	5.60	A

ANVA

n.s.

n.s. = Sin diferencia significativa.

** = Altamente significativa

C.V. = 3.84

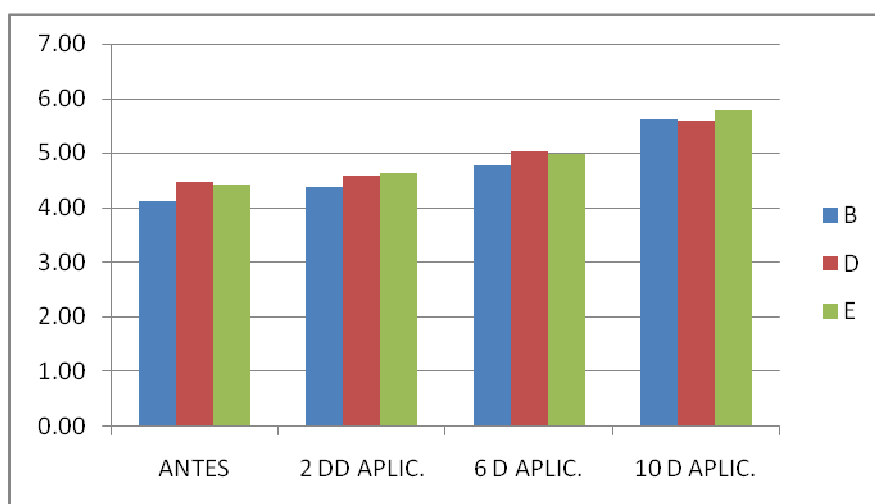


Figura 22.- Distribución de la población de adultos de *Bemisia tabaci*

V. DISCUSIÓN

Los análisis químicos realizados en este estudio, han demostrado que el extracto acuoso liofilizado de *Hura crepitans* contiene saponinas, flavonoides y otros compuestos fenólicos. Además según el análisis por HPLC-DAD, la similitud de los tiempos de retención del estándar del flavonoide rutina y de la fracción 75 obtenida por fraccionamiento del extracto acuoso liofilizado indican que este compuesto está presente en la corteza de *Hura crepitans*.

El ensayo de biotoxicidad en *Artemia salina* demostró que la corteza de *Hura crepitans* es altamente tóxica en crustáceos.

En el estudio *in vitro*, la corteza de *Hura crepitans* no presentó acción biocida sobre las ninfas grandes y pequeñas de mosca blanca con un CL 50 mayor a 1000 (mg/mL).

El ensayo *in vitro* sobre pulgón demostró que la corteza de *Hura crepitans* es altamente tóxica para el insecto con un CL50 de 0.156 (mg/mL)

No se observó ningún síntoma de fitotoxicidad en el campo experimental durante el período de evaluación.

En la primera evaluación, para *Aphis gossypii* se encontró un grado de ataque regular (grado 4), para la segunda aplicación, el ataque de pulgón disminuyó a niveles que no eran problema para el cultivo (grado 2) por lo que no fue evaluado.

En la primera evaluación, para *Bemisia tabaci* se encontró un grado ligero (grado 3) de adultos y existencia de posturas y primeros estadios de ninfas (grado 2). Por la baja población de ninfas, en la primera aplicación sólo se evaluó adultos de mosca blanca. Para la segunda aplicación, se incrementó el ataque de ninfas de mosca blanca, llegando a un grado ligero (grado 3) y los

adultos llegaron a un grado regular (grado 4). Por este motivo en la segunda aplicación se evaluaron ninfas y adultos de mosca blanca.

Los resultados obtenidos para *Aphis gossypii* en el estudio en campo indican que con los tratamientos utilizados, la población de pulgones disminuyó significativamente en comparación con el testigo, pero entre los tratamientos probados no hay diferencia estadística entre ellos y el testigo comercial (Rotebiol). Además, los coeficientes de variabilidad (C.V.) nos indican que en las evaluaciones de campo se ha cometido error, pero dentro de los máximos permitidos, lo que permite afirmar, que la metodología utilizada en el campo se ajusta muy bien al diseño estadístico utilizado.

En la primera aplicación, los resultados obtenidos para adultos de *Bemisia tabaci* en el estudio de campo indican que no hay diferencia estadística entre los tratamientos en estudio, incluido el testigo, antes de la aplicación, ni 10 días después de la aplicación. Se observó un incremento en la población de mosca blanca después de la aplicación, lo que permite afirmar que los tratamientos utilizados no controlaron los adultos de mosca blanca en condiciones de campo, incluso el testigo comercial.

Los resultados de la segunda aplicación fueron similares a los de la primera aplicación, lo que confirma que los tratamientos ensayados no controlan adultos de mosca blanca. En cuanto a ninfas de mosca blanca, tampoco son controladas por los tratamientos empleados.

En el estudio de campo, la corteza de *Hura crepitans* no presentó acción biocida sobre las ninfas de *Bemisia tabaci*. Al momento de la aplicación, la población de *B. tabaci* era alta lo que pudo afectar la efectividad del biocida. Otra razón de la baja mortalidad pueden ser los mecanismos de defensa como la puesta de huevos, muda o la propiedad lipofílica de su cubierta.

No se pudo probar en el estudio en campo la dosis de 50mg/mL de liofilizado de corteza de *Hura crepitans* debido a que la cantidad necesaria para las dimensiones del campo era demasiado alta.

A pesar de que la dosis de 2.85mg/mL no demostró un efecto tóxico alto en la prueba *in vitro* sobre *Aphis gossypii*, éste tuvo una alta toxicidad en la prueba de campo.

Con respecto a la población de controladores biológicos encontrados durante la prueba de campo, ésta se incrementó en todos los tratamientos, lo que indica que los productos aplicados, no afectaron la fauna benéfica. Los controladores presentes fueron los coccinélidos, las chrysoperlas y arañas, también se llegó a observar en el campo Hemerobius y la mosca de la familia Dolichopodidae.

VI. CONCLUSIONES

El extracto acuoso liofilizado de la corteza de *Hura crepitans* posee acción biocida *in vitro* (CL50 = 0.156mg/mL) y en campo sobre adultos de *Aphis gossypii*.

El extracto acuoso de la corteza de *Hura crepitans* no tiene actividad biocida *in vitro* ni en campo sobre ninfas de *Bemisia tabaci*.

En el estudio *in vitro*, la dosis de mayor toxicidad para *Aphis gossypii* fue 50mg/mL.

En el estudio de campo, la dosis 2.85mg/mL fue efectiva sobre *Aphis gossypii*.

La corteza de *Hura crepitans* contiene el flavonoide rutina, caracterizado mediante reacciones químicas y por HPLC-DAD. Presenta también otros compuestos fenólicos y saponinas.

VII. RECOMENDACIONES

Ejecutar seguimiento de la fluctuación poblacional de *Bemisia tabaci* desde el inicio del crecimiento del algodón.

Disminuir la población de adultos de *Bemisia tabaci* mediante trampas amarillas, para luego hacer la aplicación en el campo con población mayor de ninfas y baja de adultos.

Estudiar el extracto acuoso de la corteza de *Hura crepitans* en los demás fitófagos de importancia del algodón.

Estudiar diferentes tipos de extracto de la corteza de *Hura crepitans* sobre *Bemisia tabaci*.

Repetir el estudio en campo de la acción biocida del extracto acuoso liofilizado de la corteza de *Hura crepitans* en áreas más grandes y en diferentes estados fenológicos del cultivo del algodón.

Investigar si el flavonoide rutina tiene acción biocida.

Identificar los demás metabolitos presentes en la corteza de *Hura crepitans*.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Geilfus F. El Árbol al Servicio del Agricultor. Manual de Agroforestería para el Desarrollo Rural. Guía de Especies. Enda – Caribe. CATIE 1989; 2:778.
2. Trujillo E. Requerimientos, Limitaciones y Usos de Especies Forestales en Colombia. Revista Informativa del Proyecto SIG-PAFC. 1997; 4 (14): 6-235.
3. Francis J. *Hura crepitans* L. Sandbox, molinillo, jabillo. SO-ITF-SM-38. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station; 1990.
4. Brack A. Diccionario Enciclopédico de Plantas. Cusco: CBC; 1999.
5. Mahecha V., Echeverri R. Árboles del Valle de Cauca. Bogota; 1983.
6. Martinez A. Flavonoides. Medellín: 2005.
7. Ferreira L., Barreto V., Vieira De Figueredo L., Costa L. O uso de Fiterápicos e a Saúde Bucal. Saúde Revista. 2005; 7(16): 11-17. <http://www.unimep.br/phpg/editora/revistaspdf/saude16art02.pdf><feb.2009>.
8. Duke A. National Genetic Resources Program. Phytochemical and Ethnobotanical Databases. 2004. National Germoplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. <http://www.ars-grin.gov/duke/plants.html> <marzo-mayo, 2009>.
9. Barbieri L., Falasca A., Franceschi C., Licastro F., Rossi C., Stirpe F. Purification and Properties of Two Lectins from the Latex of the Euphorbiaceous Plants *Hura crepitans* L. (Sand-Box Tree) and *Euphorbia characias* L. (Mediterranean Spurge). Biochem. J. 1983; 215:433-439.
10. Falasca A., Franceschi C., Stirpe F. Mitogenic and Haemagglutinating

- Properties of a Lectin Purified from *Hura crepitans* seeds. Biochim. Biophys. Acta 632. 1980:95-105.
11. Njoku O., Ononogbu I., Nwaneri V., Ugwuanyi J. Lipase Activity in *Hura crepitans* Seed Endosperm During Germination. Nigeria J. Bot. 1996; 9: 21-26.
 12. Fagbemi T., Adebawale K. Food Potential of *Hura crepitans*. Proceedings of the 24th Annual Conference of Nigerian Institute of Food Science and Technology (NIFST); 2000; Bauchi, Nigeria.
 13. Adedire C., Ajayi O. Potential of Sandbox, *Hura crepitans* L. Seed Oil for Protection of Cowpea Seeds from *Callosobruchus maculatus* Fabricius (Coleoptera: Bruchidae) Infestation. Journal of Plant Diseases and Protection. 2003; 110(6): 602-610.
 14. Regnault-Roger C., Vincent C., Philogène B. Biopesticidas de Origen Vegetal. Madrid: Mundi-Prensa; 2004.
 15. Lampkin N. Agricultura Ecológica. Madrid: Mundi-Prensa; 2001.
 16. Rodríguez S., H.H. Determinación de Toxicidad y Bioactividad de Cuatro Insecticidas Orgánicos Recomendados para el Control de Plagas en Cultivos Hortícolas. Revista Latinoamericana de Agricultura y Nutrición. 1998; 1(3): 14-21.
 17. Freeland T., Pettigrew B., Thaxton P., et al. Agrometeorology and Cotton Production. World Meteorological Organization. 2006.
 18. Asociación Naturland. Agricultura Orgánica en el Trópico y Subtrópico. Algodón. 1 ed. 2000.
 19. Lizarraga A. Algodón Orgánico y el Efecto de las Plantas Transgénicas sobre su Desarrollo. Organic Exchange. 2008

20. Brack A. El Algodón Peruano 2004
21. Ministerio del Medio Ambiente y Bosques y Departamento de Biotecnología del Ministerio de Ciencia y Tecnología. Gobierno de India. Biology of Cotton.
22. Pesticides Used in Cotton. Pesticides News. 1995; (28): 23.
23. International Cotton Advisory Committee. Producción de Algodón Orgánico – IV. EEUU: ICAC; 1998.
24. Sánchez G., Sarmiento J. Plagas del Cultivo de Algodonero. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2002.
25. Alata J. Lista de Insectos y Otros Animales Dañinos a la Agricultura en el Perú. Est. Exp. Agr. La Molina. Manual N° 38 Min. De Agric. Lima. 1973.
26. De Souza A. Atividade Inseticida e Modo de Ação de Extratos de Meliaceas sobre *Bemisia tabaci* (Genn. 1889) Biotipo B. [Tesis doctoral]. Piracicaba. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidad de Sao Paulo; 2004.
27. Carabali A. Potencial de Resistencia de Diferentes Genotipos de Yuca *Manihot esculenta* Crantz al “Biotipo B” de Mosca Blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae). [Tesis de grado]. Cali. Departamento de Biología, Universidad del Valle; 2004.
28. Mateus C., Amaro, F., Louro D., Mexia A. Presença e Impacto de *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera: Aleyrodidae) em Culturas Horticolas em Portugal. Revista de Ciencias Agrarias. 2008; 31(1), 163-172.
29. Jones R. Effect of Cotton Aphids, *Aphis gossypii* (Glover), on Cotton Plant Development and Yields Components. [Tesis de Maestría]. Louisiana. Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College; 2004.

30. Shannag H., Al-Qudah J., Makhadmeh I., et al. Differences in Growth and Yield Responses to *Aphis gossypii* Glover between Different Okra Varieties. Plant Protect. Sci. 2007; 43(3): 109-116.
31. Lock O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el Estudio de Productos Naturales. Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú; 1994.
32. Canpolat E., Kaya M. Studies on Mononuclear Chelates Derived from Substituted Schiff Base Ligands (Part 4): Synthesis and Characterization of a New 5-Hydroxysalicyliden-PAminoacetophenoneoxime and Its Complexes with Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II). Turk. J. Hem. 2005; 29: 409-415.
33. Mabry T., Markham K., Thomas M. The Systematic Identification of Flavonoids. New York-Heidelberg: Springer Verlag; 1970.
34. Zapata M. Desarrollo y Evaluación Física y Química de un Refresco a Base de Pitahaya (*Hylocereus undatus*). [Tesis de grado]. Zamorano: Carrera Agroindustria Alimentaria, Universidad de Zamorano; 2007.
35. Gutiérrez D., Ortiz C., Mendoza A. Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal. En: Simposio de Metrología. Santiago de Querétaro: Universidad Autónoma de Querétaro; 2008.
36. Reich E., Schibli A. High-Performance Thin Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants. New York: Thieme Medical Publisher, Inc.; 2007.
37. Programa Iberoamericano de Ciencias y Tecnología para el Desarrollo (CYTED), Manual de Técnicas de Investigación, 2000.

38. Mansaray A., Sundufu A. Oviposition, Development and Survivorship of the Sweetpotato Whitefly *Bemisia tabaci* on Soybean, *Glycine max*, , and the garden bean, *Phaseolus vulgaris*. Journal of Insect Science. 2007; 9(1):1-6.
39. Departamento Técnico de la Asociación de Productores de Cítricos del Perú. Crianza de parasitoides de pulgones que atacan a los cítricos. Citrinotas-ProCitrus. Boletín 32. Enero Febrero. 2006.
40. Michelotto M., Adaime Da Silva R., Busoli A. Tabelas de vida para *Aphis gossypii* Glover, 1877 (Hemiptera: Aphididae) em Tres Espécies de Plantas Daninhas. Bol. San. Veg. Plagas. 2004; 30: 211-217.
41. Michelotto M., Da Silva R., Busoli A. Tabelas de Esperança de Vida e Fertilidade para *Aphis gossypii* Glover. 1877 (Hemiptera: Aphididae) em Tres Cultivares de Algodoeiro. Bol. San. Veg. Plagas. 2003; 29: 331-337.
42. Ferreira Freitas da Mata R. Efeito de Extratos Aquosos de *Cabralea canjerana* subsp. *Polytricha* (adr. Juss.) penn. (Meliaceae) No Controle Biológico de *Brevycorine brassicae* (L.) (Hemiptera: Aphididae) E *Ascia monuste orseis* (Godart) (Lepidoptera: Pieridae). [Tesis de maestría] Uberlandia: Instituto de Biología, Universidade Federal de Uberlandia; 2007.
43. De Souza A., Vendramim J. Atividade Inseticida de Extratos Aquosos de Meliáceas sobre a Mosca Branca *Bemisia tabaci* (Genn.) Biotipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). Neotropical Entomology. 2001. 30(1), 133-137.
44. De Souza A., Vendramim J. Efeito de Extratos Aquosos de Meliáceas sobre *Bemisia tabaci* Biótipo B em Tomateiro. Bragantia, Campinas. 2000; 59(2), 173-179.
45. Da Silva Correa R. Toxicidade de Extratos de *Lonchocarpus floribundus* Benth. (Timbo) sobre *Toxoptera citridus* Kirkaldy (Pulgao preto dos citros) (Sternorrhyncha: Aphididae). [Tesis de grado]. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia – INPA; 2006.

46. Gonzáles Bachini J. 1982. Manual de Evaluación y Control de Insectos y Ácaros del Algodonero. FUNDEAL.

IX. ANEXOS

Anexo 1.- Constancia de clasificación taxonómica de *Hura crepitans*



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA

MUSEO DE HISTORIA NATURAL



CONSTANCIA N° 024- USM-2010

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (completa), recibida de la FACULTAD de FARMACIA Y BIOQUIMICA de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ha sido estudiada y clasificada como: *Hura crepitans* L., y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

ORDEN: EUPHORBIALES

FAMILIA: EUPHORBIACEAE

GENERO: *Hura*

ESPECIE: *Hura crepitans* L.

Nombre vulgar: " Catahua "

Determinada por: Mg. Joaquina Albán C.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de investigación.

Lima, 25 de Enero de 2010.



Mg. Joaquina Albán Castillo.
JEFE Jefa
DEL HERBARIO SAN MARCOS
(USM)-MHN

Anexo 2.- Escala de Evaluación de Gonzales Bachini J. (1982)

Escala de evaluación para pulgones y mosca blanca		
Grado 1	Ninguna Ninfa y/o Adulto	No existe
Grado 2	De 1 a 5 Ninfas y/o Adulto	Existe
Grado 3	De 6 a 20 Ninfas y/o Adulto	Ligero
Grado 4	De 21a 50 Ninfas y/o Adulto	Regular
Grado 5	De 51 a 100 Ninfas y/o Adulto	Fuerte
Grado 6	> de 100 Ninfas y/o Adulto	Muy fuerte